



Università degli Studi della Tuscia

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE)

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ECOSISTEMI E SISTEMI PRODUTTIVI (XXIX Ciclo)**

*Filogeografia, Biosistemica e Genetica del Paesaggio di alcune specie italiane del
genere Quercus
(s.s.d. AGR/05)*

Coordinatore: Prof. Alessandro Sorrentino

Tutor: Dr. Marco Cosimo Simeone

Dottoranda: Martina Vitelli

Anno 2017

... *“Fin dalle origini il destino degli uomini è stato associato a quello degli alberi con legami talmente stretti (quasi ancestrali) che è lecito chiedersi che cosa ne sarà di un’umanità che sta brutalmente spezzando questi legami” ...*

Abstract

Sclerophyllous oaks of *Quercus* Group Ilex are emblematic components of the Mediterranean landscapes and the full extent of their diversity in a geographic context is still poorly assessed. In order to detail differentiation patterns within Group Ilex and to illuminate causes and circumstances that underlie the distribution of its lineages, we examined plastome differentiation in the four species currently representing this oak group across the Mediterranean Basin (*Quercus ilex*, *Quercus coccifera*, *Quercus aucheri*, *Quercus alnifolia*).

Plastid DNA variation was explored with three markers on 124 individuals and spatial analyses were performed with phylogenetic and landscape genetics approaches. A strong geographic sorting, entirely decoupled from species boundaries, was found. Spatial coincidences with phylogenetic splits highlights the presence of four geographic regions (the Middle East, the Aegean region, the central and the western Mediterranean) characterized by different degrees of isolation. Distinct sub-regional structures were identified.

Inter- and intra-lineage divergence patterns appear to reflect the complex orogeny of the Mediterranean region and Pleistocene climatic oscillations, while a few widespread haplotypes might represent the remnants of the ancestral Group Ilex range. Regional differentiation in this group is recognized to be triggered by a number of factors, including disruption of the original range, incomplete lineage sorting, repeated phases of asymmetrical introgression and isolation. The key role played by some Mediterranean regions on the range establishment and dynamics of this oak group is discussed.

Keywords: Chloroplast DNA, *Quercus*, Mediterranean Basin, Landscape genetics, Phylogeographical inference

Riassunto

Svelare i processi evolutivi del passato che hanno modellato l'attuale distribuzione delle risorse genetiche forestali, è importante per consentire una corretta futura gestione delle zone chiave per la presenza di una elevata biodiversità. Le querce sono componenti emblematici dei paesaggi europei e mediterranei e la piena estensione della loro biodiversità in contesti geografici specifici è ancora poco studiata.

Con l'obiettivo di svelare i loro modelli di differenziazione e fare luce sulle cause e le circostanze che sono state alla base della formazione e della distribuzione delle diverse discendenze biologiche, in questo lavoro sono state esaminate le strutture genetiche delle principali specie sclerofille del genere *Quercus*, applicando diverse metodologie di studio. È stata esplorata la variazione del DNA plastidiale di tre marcatori molecolari su un totale di 124 individui appartenenti alle quattro specie di querce che attualmente formano il gruppo Ilex (*Quercus ilex*, *Quercus coccifera*, *Quercus aucheri* e *Quercus alnifolia*) nell'interno del bacino del Mediterraneo; sui dati ottenuti sono state poi eseguite analisi spaziali con approcci statistici, filogenetici e di genetica del paesaggio (Landscape Genetics).

È risultato evidente un forte ordinamento geografico del tutto slegato dai reali confini delle specie prese in esame.

La coincidenza spaziale tra diverse discendenze filogenetiche ha messo in risalto l'esistenza di quattro regioni geografiche distinte (Medio Oriente, la regione dell'Egeo, il Mediterraneo centrale ed occidentale) caratterizzate da diversi gradi di isolamento. Al loro interno sono state identificate distintamente delle strutture sub-regionali. Tali pattern di divergenza inter-ed intra-specifici sembrano riflettere la complessità dei processi di orogenesi avvenuti nella regione del Mediterraneo a partire dal Miocene e le oscillazioni climatiche del Pleistocene, mentre la diffusione di alcuni componenti genetiche sembra rappresentare la distribuzione antica di membri del Gruppo Ilex ancestrale.

Pertanto la differenziazione regionale in questo gruppo di querce risulta essere stato determinato da una complessa serie di fattori tra cui la frammentazione di un antico areale originale, una incompleta ripartizione della variazione genetica nelle diverse discendenze, ripetute fasi di ibridazione e introgressione asimmetrica e di isolamento.

INDICE

1- INTRODUZIONE

1.1-	<i>Il genere Quercus</i>	7
1.2-	<i>Le problematiche del genere Quercus</i>	8
1.3-	<i>Le classificazioni subgeneriche proposte</i>	9
1.4-	<i>Querce del gruppo Ilex</i>	14
	- <i>Quercus ilex L.</i>	14
	- <i>Quercus coccifera L.</i>	16
	- <i>Quercus alnifolia Poech.</i>	18
	- <i>Quercus aucheri Jaubert & Spach</i>	19
1.5-	<i>Querce a rischio di estinzione</i>	20
1.6-	<i>Cambiamenti climatici e impatti sulle foreste</i>	22
1.7-	<i>Ecoregione mediterranea</i>	26
	- <i>Rifugi glaciali</i>	30
	- <i>Il ruolo degli stretti</i>	31
1.8-	<i>La genetica del paesaggio e la filogeografia</i>	33
1.9-	<i>Studi pregressi I: il genere Quercus</i>	34
1.10-	<i>Studi pregressi II: le querce del gruppo Ilex</i>	37
1.11-	<i>Scopo del lavoro</i>	41

2- MATERIALI E METODI

	- <i>Campionamento floristico</i>	42
2.1	- <i>Protocollo molecolare</i>	48
	- <i>Estrazione del DNA</i>	48
	- <i>Amplificazione dei frammenti marcatori</i>	48
	- <i>Purificazione del DNA amplificato</i>	49
	- <i>Sequenziamento</i>	50
2.2	- <i>Marcatori molecolari utilizzati</i>	50
	- <i>RbcL</i>	50
	- <i>MatK</i>	51
	- <i>TrnH-psbA</i>	52

2.3 - <i>Analisi statistiche e filogeografiche</i>	55
2.4 - <i>Analisi della struttura genetica spaziale</i>	56
3- RISULTATI	
3.1- <i>Diversità genetica e relazioni filogeografiche</i>	57
3.2- <i>Struttura genetica spaziale</i>	62
4- DISCUSSIONI	
4.1- <i>La diversità genetica nelle querce mediterranee del gruppo Ilex</i>	68
4.2- <i>Pattern di condivisione aploipica</i>	70
4.3- <i>Relazioni filogeografiche</i>	71
4.4- <i>Sottostrutture regionali</i>	73
5- CONCLUSIONI	76
6- BIBLIOGRAFIA	78

1. INTRODUZIONE

1.1 Il genere *Quercus*

Le querce (genere *Quercus*, Fagaceae) sono tra le angiosperme legnose economicamente più importanti ed ecologicamente più diverse dell'emisfero nord, e sono spesso dominanti nei paesaggi Mediterranei.

Il genere comprende circa 500-600 specie, con un *range* altitudinale che varia dal livello del mare fino ai 4000 metri delle regioni himalayane. Queste si trovano nelle foreste temperate, subtropicali e tropicali, così come anche nelle steppe, nelle macchie e in boschi aperti dell'Eurasia, Nord Africa, America del nord e America centrale (Govaerts and Frodin 1998, Menitsky 2005). Come arbusti o come alberi di grandi dimensioni, a foglia caduca o sempreverdi, con varie forme di transizione, giocano un ruolo ecologico fondamentale per numerose comunità di piante e animali e forniscono un grande contributo al sostentamento della biodiversità globale (Tovar-Sanchez and Oyama 2004, Holz and Gradstein 2005, Blondel et al. 2010). Le querce offrono anche un'immensa potenzialità come serbatoio di biodiversità sia animale che vegetale; infatti, le differenti tipologie di microclima e microhabitat a disposizione danno ospitalità ad un elevato numero di comunità animali, vegetali e microbiche, ognuna con particolari esigenze ecologiche. Nel tempo, quindi, le querce hanno acquistato un'importanza ecologica globale, scientifica ed economica, oltre che un elevato valore naturalistico e simbolico in molti paesi (Menitsky 2005).

Oltre a questi fattori, le formazioni vegetali quercine hanno da tempo accresciuto l'interesse di molti studiosi anche per la grande complessità tassonomica che le caratterizza e per l'elevata attitudine all'incrocio che queste manifestano, stimolando nel tempo lunghe ricerche sull'evoluzione, l'ibridazione interspecifica, l'introggressione, la biosistemica, la filogeografia ed altre tematiche volte alla conservazione della biodiversità vegetale ed ecosistemica. Ciononostante, molte specie purtroppo sono oggi a rischio estinzione (IUCN 2016) principalmente a causa dei cambiamenti di uso del suolo, dello sfruttamento delle risorse naturali, del pascolo intensivo, dell'alterazione dei numerosi livelli di organizzazione biologica e dello sfruttamento non sostenibile delle risorse legnose (Johnson et al. 2002). Anche i continui cambiamenti climatici, derivanti principalmente dall'aumento della concentrazione dei gas serra in atmosfera, costituiscono un fattore aggiuntivo di minaccia per la sopravvivenza di molte specie, per il rimodellamento della distribuzione delle specie sul territorio, ed una causa di impoverimento della ricchezza genetica, specialmente in alcune zone altamente vulnerabili come il bacino del Mediterraneo (Giorgi 2006, Klausmeyer and Shaw 2009, Lefevre et al. 2013) e la California (McIntyre et al. 2015).

Il bioma mediterraneo infatti ha oggi una priorità di conservazione globale proprio per l'elevata diversità di specie vegetali e la loro densità, che rivaleggia con quella delle foreste pluviali tropicali. La straordinaria diversità vegetale e gli endemismi presenti sono il risultato di processi evolutivi durati milioni di anni, indotti da cicli annuali di siccità estive, inverni miti e umidi, alta varietà topografica e bassa fertilità del suolo. Nonostante la sua importanza, si prevede che questo bioma entro il 2100, subirà una esponenziale perdita di biodiversità a causa della sua notevole sensibilità alle minacce e l'interazione di quest'ultime.

1.2 *Le problematiche del genere Quercus*

Storicamente, il genere *Quercus* presenta grosse difficoltà tassonomiche poiché, a causa dell'elevato polimorfismo, sono stati descritti numerosi *taxa*, che spesso risultano corrispondenti a variazioni intraspecifiche o individuali locali, e risultano di incerta collocazione, sinonimie, o basate su schemi nomenclaturali discordanti. La causa di tutto questo è stata tradizionalmente attribuita ad una identificazione di queste entità resa spesso difficoltosa per la presenza di numerosi ibridi che riducono la delimitazione delle singole specie l'una rispetto all'altra; la corrispondenza tra i caratteri morfologici ed ecologici risulta pertanto complessa soprattutto laddove più specie affini vivono in contatto. Di fatto, è da decenni in corso una continua revisione dei nomi ed un continuo rigetto di classificazioni ormai datate e spesso tra loro contrastanti. Questo fenomeno è soprattutto visibile nelle numerose flore o negli inventari forestali effettuati a livello locale (regionale o nazionale). In generale, si può affermare che definire infatti una chiave tassonomica inconfutabile e ripetibile per le querce è molto difficile a causa delle differenze morfologiche minime, a volte inesistenti, tra le varie specie, soprattutto lungo areali di distribuzione molto vasti. Infatti, i caratteri realmente diagnostici sono scarsi e di non sempre di immediata rilevazione (ad esempio il tegumento esterno del polline, caratteri microscopici fogliari, anatomia dell'ovario, etc.). Inoltre, la forte adattabilità all'ambiente e l'ibridazione giocano indubbiamente un ulteriore ruolo di disturbo. Diventano quindi indispensabili criteri di identificazione che impieghino caratteri qualitativi (e non quantitativi) e che non siano influenzabili dall'ambiente circostante o dall'età degli individui stessi. In questo modo possono essere evitati fenomeni di evoluzione parallela o convergente che disturberebbero il segnale filogenetico (Tucker 1974; Jones 1986). Questo tipo di problemi ha addirittura generato una crescente incertezza sui tradizionali concetti di specie e sull'inadeguatezza di questi ultimi nel descrivere appieno una complessa serie di sistemi di popolazioni in coevoluzione (Simeone et al. 2013).

Attualmente, l'interesse scientifico degli studiosi si sta focalizzando nella comprensione biologica dei modelli evolutivi di questo genere attraverso l'utilizzo di diversi marcatori molecolari (Petit et al. 2003; Oh & Manos 2008; Lepais et al. 2009; Denk & Grimm 2010). Tuttavia ancora oggi rimane controversa e incompleta la sistematica delle specie in alcune bioregioni scarsamente studiate. Per questo motivo le differenziazioni ecologiche e geografiche delle diverse popolazioni delle querce sono un crescente oggetto di studio per le ricerche in corso e quelle future. Tuttavia, nonostante le più recenti indagini molecolari abbiano modificato in diversi punti le classificazioni tradizionali, basate su caratteri morfologici, un grande numero di specie non può essere ancora discriminato senza ambiguità. A questo proposito si deve notare che il potenziale filogenetico e biosistemico dei genomi nucleare e plastidiale delle querce europee e, soprattutto, delle querce della macchia mediterranea, non è stato ancora pienamente esplorato.

1.3 Le classificazioni subgeneriche proposte

Un primo esame della classificazione delle specie del genere *Quercus* può essere attribuito ad Örsted (1867). Egli ha suddiviso il genere in quattro sottogeneri, tre dei quali composti da specie del Vecchio Mondo: *Lepidobalanus* con stilo corto e capitato e con squame della cupola appressate (e.g. *Q. ilex*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. robur*); *Heterobalanus* con stili lunghi ed appuntiti e squame come in *Lepidobalanus* (comprendente ad esempio *Q. semecarpifolia*); *Cerris* con stili lunghi, stretti e appuntiti e squame della cupola divelte (e.g. *Q. cerris*, *Q. suber*, *Q. trojana*).

In seguito Camus (1936-38) ha preferito suddividere il genere *Quercus* in due sottogeneri: *Cyclobalanopsis* Schneid., che comprende querce con cupole formate da serie di squame fuse assieme, e *Euquercus* Hickel & Camus con le squame libere. Nel primo sottogenere sono collocate specie esclusive delle Montagne dell'Asia orientale temperata o tropicale; il secondo sottogenere è suddiviso ancora nelle sezioni: *Erythobalanus*, *Protobalanus* e *Macrobalanus* (del continente americano); *Lepidobalanus* (dell'emisfero boreale) e *Cerris* e *Mesobalanus* dell'Eurasia. Più recentemente, Krüssman (1984-1986) ha proposto invece una classificazione basata su tre sottogeneri: *Cyclobalanus* (con lo stesso valore tassonomico e corologico proposto dalla Camus), *Erythobalanus* Oerst, (querce esclusivamente americane con stili lineari e allungati, ghiande maturanti in due anni con tegumento internamente tomentoso) e *Lepidobalanus* (querce in prevalenza euroasiatiche, alcune nordafricane, con stili subulati e acuti, ghiande maturanti in uno o due anni con tegumento mai internamente tomentoso). Quest'ultimo sottogenere è ripartito nelle seguenti sezioni: *Robur*, *Gallifera*, *Cerris*, *Suber*, *Ilex*.

Nixon (1993) ha riproposto lo schema tassonomico della Camus dandone però un'interpretazione strettamente filogenetica: anch'egli suddivide il genere in due sottogeneri, *Cyclobalanopsis* e *Quercus* (= *Euquercus*), ma si differenzia dalla Camus per il diverso modo di aggregare le specie in sezioni. Le sezioni del subg. *Quercus* sono: *Lobatae* (gruppo delle querce rosse Nordamericane), *Protobalanus* (querce del settore occidentale del continente americano, dall'Oregon al Messico, ritenute ancestrali) e *Quercus* (specie del Nord America e dell'Eurasia che racchiude anche i “gruppi *Cerris* e *Ilex*”).

Tuttavia, esclusivamente per le specie europee, particolarmente seguita oggi è la classificazione di Schwarz, riportata in *Flora Europea* (1993). Per questo autore le querce europee si suddividono in 3 sottogeneri, ai quali sono da affiancare le specie del subgen. *Erythrobalanus* principalmente diffuse in America:

1. *Cerris* (Spach) Oersted: foglie persistenti, semipersistenti o decidue, ghianda maturante di norma nel secondo anno con endocarpo tomentoso (proprio quest'ultimo sembra essere il carattere morfologico distintivo di queste querce dalle “*querce bianche*” (Manos *et al.* 1999).
2. *Quercus* Örsted: (corrispondente alla Sect. *Quercus sensu* Nixon, Sect. *Mesobalanus* e *Lepidobalanus sensu* Camus, Sect. *Robur* e *Gallifera sensu* Krüssmann: “*Querce bianche*”), gruppo polifiletico di specie distribuite in Nordamerica ed Eurasia a foglie decidue o semipersistenti con caratteristica posizione basale degli ovuli abortivi sulla superficie del frutto, quest'ultimo maturante nell'anno e con endocarpo glabro; secondo Nixon, il gruppo racchiude anche i “gruppi *Cerris* e *Ilex*”; secondo Camus il gruppo raccoglie anche *Q. ilex*.
3. *Sclerophyllodrys*: gruppo monofiletico di specie esclusivamente euroasiatiche con foglie persistenti a lamina spessa, ghianda maturante in uno o due anni, endocarpo tomentoso. Il sottogenere corrisponde a: *Ilex group sensu* Nixon, Sect. *Ilex* e *Suber sensu* Krüssmann (includendo perciò *Q. suber*), Sect. *Cerris* (Subsect. *Cocciferae*) e Sect. *Lepidobalanus* (Subsect. *Ilex*) *sensu* Camus (raggruppando *Q. ilex* con le querce bianche e le altre sclerofille con il gruppo *Cerris*).
4. *Erythrobalanus* (Spach) Örsted (America centro-settentrionale): ghianda maturante nel secondo anno e endocarpo tomentoso. Comprende le cosiddette “*querce rosse*” e “*querce nere*” americane.

Infine, il sistema di classificazione più recente è attribuibile a Menitsky (2005). Egli riprende quello del 1938 di Maleev modificato da Sokolov nel 1951, in cui le querce euro-asiatiche sono divise nei sottogeneri *Lepidobalanus*, *Protobalanus* (con le sezioni *Ilex* e *Coccifera*) e *Cyclobalanopsis* senza suddivisioni. Il sottogenere *Lepidobalanus* include: la sezione *Cerris* che contiene, come nel sistema di Schwarz, non solo le querce decidue ma anche quelle sempreverdi del gruppo *Q. suber*, la sezione *Cerridopsis* (con specie del gruppo *Q. macranthera*) isolata più di recente in una sezione *Dentata* (con *Q. dentata*) e la sezione *Eulepidobalanus* con le sottosezioni *Robur*, *Ponticae*, *Galliferae* e *Diversipilosae* (con corteccia liscia).

Menitsky (2005) ricalca il sistema di classificazione descritto in precedenza, ad eccezione del trasferimento delle specie sempreverdi (affinità con il gruppo della *Q. suber* e *Q. semecarpifolia*) dalla sezione *Cerris* delle querce decidue ad un altro sottogenere con le querce a foglia coriacea, sulla base della somiglianza del tipo di struttura della lamina fogliare e di peculiarità anatomiche del legno, abbassando il rango delle rimanenti sottodivisioni del sottogenere a sottosezioni basate sul riconoscimento delle origini comuni e della vicinanza filogenetica dei gruppi affini *Q. robur*, *Q. macranthera*, *Q. pontica*, *Q. dentata* aventi un antenato comune Est-Asiatico più prossimo a *Q. griffithi*. Nel sottogenere *Protobalanus*, chiamato in seguito *Heterobalanus* come per Ørsted ha incluso le querce suberoidi (*Q. semecarpifolia*, *Q. suber* e altre).

Ad oggi, gli studiosi riconoscono con difficoltà, approssimazione e, spesso, con notevole confusione, tali suddivisioni, e spesso “mediano” tra le monografie tradizionali basandosi su morfologia e geografia.

Per fare chiarezza in questo scenario così confuso ed incerto, Denk e Grimm (2010) hanno provato a dare un’interpretazione molecolare della tassonomia, ed hanno pubblicato un lavoro sulle querce dell'Eurasia rivisitando le suddivisioni interne del genere con l’ausilio di marcatori nucleari ribosomiali ITS (Internal Transcribed Spacers), ETS (External Transcribed Spacer) e 5S rDNA. Grazie alle loro ricerche hanno condensato tutti i sottogeneri delle vecchie tassonomie da Ørsted (1871) fino a Nixon (1993) in sei gruppi principali così composti:

1. ***Cerris***: specie eurasiatiche; racchiude subgen, *Quercus sensu* Menitsky (sez. *Cerris*), parte del subgen. *Cerris sensu* Schwarz e *sensu* Camus, “gruppo *Cerris*” *sensu* Nixon. Specie generalmente decidue con maturazione del frutto annuale o biennale; scaglie della cupola embriate, ricurve ed allungate; foglie generalmente tomentose.
2. ***Ilex***: specie principalmente dell'Ovest dell'Eurasia che corrispondono approssimativamente al subgen. *Heterobalanus sensu* Menitsky, subgen. *Sclerophyllodris* e parte del subgen. *Cerris sensu* Schwarz, sez. *Lepidobalanus* e tre sottosezioni della sez. *Cerris sensu* Camus;

- “gruppo *ilex*” *sensu* Nixon. Racchiude il subgen. *Heterobalanus sensu* Menitsky. Caratterizzate dalle scaglie della cupola embricate e appressate o deflesse; foglie più o meno tomentose e maturazione del frutto annuale o biennale.
3. ***Quercus***: corrisponde al subgen. *Quercus*, sez. *Quercus sensu* Menitsky, subgen. *Lepidobalanus sensu* Schwarz, un'ampia parte della sezione *Lepidobalanus sensu* Camus, gruppo delle "querce bianche" *sensu* Nixon. Unico gruppo con maturazione del frutto annuale; specie decidue e sempreverdi. Scaglie della cupola embricate, corte o più o meno allungate, appressate o patenti. Distribuite in Eurasia occidentale e Nord America.
 4. ***Lobatae***: areale nordamericano. Include sez. *Lobatae sensu* Nixon; sez. *Erythrobalanus sensu* Camus; genere *Erythrobalanus sensu* Schwarz. Specie a maturazione del frutto annuale o biennale; decidue o sempreverdi; scaglie embricate più o meno appressate alla cupola.
 5. ***Protobalanus***: querce nordamericane. Il gruppo racchiude la sez. *Protobalanus sensu* Camus e Nixon, subgen. *Sclerophyllodris* sez. *Protobalanus sensu* Schwarz. Specie sempreverdi generalmente biennali; scaglie della cupola embricate e brevemente appressate.
 6. ***Cyclobalanopsis***: questo gruppo racchiude subgen. *Cyclobalanopsis sensu* Camus e Nixon; genere *Cyclobalanopsis sensu* Schwarz e subgen. *Cyclobalanoides sensu* Menitsky. Specie sempreverdi con maturazione del frutto annuale o biennale; scaglie della cupola lamellate in anelli concentrici e fuse lateralmente. Distribuzione asiatica.

Di seguito si riporta una tavola sinottica con la descrizione dei sottogeneri appena descritti (Fig.1 - da Denk and Grimm 2010).

Table 1. Subdivisions of *Quercus* with reference to previous classifications. Previously proposed infrageneric taxa not in agreement with our concept based on molecular data (this study) and patterns of pollen ornamentation (Denk & Grimm, 2009) are indicated in bold.

	Orsted (1871)	Camus (1936-54)	Schwarz (1936)	Menickij (1984)	Nixon (1993)
Group <i>Cerris</i>	<i>Q. subg. Cerris</i> p.p. - <i>Q. sect. Eucerris</i> except <i>Q. alnifolia</i> - <i>Q. sect. Suber</i>	<i>Q. sect. Cerris</i> p.p. - <i>Q. subsect. Eucerris</i> - <i>Q. subsect. Macrolepidides</i> - <i>Q. subsect. Campylolepidides</i> - <i>Q. subsect. Suber</i>	<i>Q. subg. Cerris</i> p.p. - <i>Q. sect. Aegilops</i> - <i>Q. sect. Eucerris</i> - <i>Q. sect. Erythrobalanopsis</i> - <i>Q. sect. Suber</i> <i>Q. subsect. Eusuber</i>	<i>Q. subg. Quercus</i> p.p. - <i>Q. sect. Cerris</i>	<i>Q. sect. Quercus</i> p.p. - ? " <i>Cerris</i> group" p.p.
Group <i>Ilex</i>	<i>Q. subg. Cerris</i> p.p. - <i>Q. sect. Ilicoides</i> - <i>Q. alnifolia</i> (sect. <i>Eucerris</i>) <i>Q. subg. Heterobalanus</i> <i>Q. subg. Lepidobalanus</i> p.p. - <i>Q. sect. Ilex</i> p.p.	<i>Q. sect. Cerris</i> p.p. - <i>Q. subsect. Brachylepidides</i> - <i>Q. subsect. Cocciferae</i> - <i>Q. subsect. Cypristes</i> <i>Q. sect. Lepidobalanus</i> p.p. - <i>Q. subsect. Engleriana</i> - <i>Q. subsect. Floribundae</i> - <i>Q. subsect. Ilex</i>	<i>Q. subg. Cerris</i> p.p. - Sect. <i>Suber</i> p.p. <i>Q. subsect. Heterobalanus</i> <i>Q. subsect. Cypristes</i> <i>Q. subg. Sclerophyllodrys</i> p.p. - <i>Q. sect. Coccifera</i> - <i>Q. sect. Pachyphyllum</i> - <i>Q. sect. Ilex</i> - <i>Q. sect. Protobalanus</i> p.p.	<i>Q. subg. Heterobalanus</i>	<i>Q. sect. Quercus</i> p.p. - ? " <i>Cerris</i> group" p.p. - ? " <i>Ilex</i> group"
Group <i>Quercus</i>	<i>Q. subg. Lepidobalanus</i> p.p. - <i>Q. sect. Ilex</i> p.p. - <i>Q. sect. Eulepidobalanus</i> - <i>Q. sect. Primus</i> <i>Q. subg. Macrobalanus</i>	<i>Q. sect. Lepidobalanus</i> p.p. - <i>Q. subsect. Diversipilosae</i> - <i>Q. subsect. Galliferae</i> - <i>Q. subsect. Hartwissianae</i> - <i>Q. subsect. Pachyphyllae</i> - <i>Q. subsect. Pedunculatae</i> - <i>Q. subsect. Sessiliflorae</i> - <i>Americanae</i> (26 subsects.) <i>Q. sect. Mesobalanus</i> <i>Q. sect. Macrobalanus</i>	<i>Q. Subg. Lepidobalanus</i> <i>Macrobalanus</i> (gen.)	<i>Q. subg. Quercus</i> p.p. - <i>Q. sect. Quercus</i>	<i>Q. sect. Quercus</i> p.p. - "white oaks s.s."
Group <i>Lobatae</i>	<i>Q. subg. Erythrobalanus</i>	<i>Q. sect. Erythrobalanus</i>	<i>Q. subg. Sclerophyllodrys</i> p.p. - <i>Q. sect. Lepidobalanoides</i> <i>Erythrobalanus</i> (gen.)	—	<i>Q. sect. Lobatae</i>
Group <i>Protobalanus</i>	<i>Q. subg. Lepidobalanus</i> p.p. - <i>Q. sect. Ilex</i> p.p.	<i>Q. sect. Protobalanus</i>	<i>Q. subg. Sclerophyllodrys</i> p.p. - <i>Q. sect. Protobalanus</i> p.p.	—	<i>Q. sect. Protobalanus</i>
Group <i>Cyclobalanopsis</i>	<i>Cyclobalanopsis</i> (gen.)	<i>Q. subg. Cyclobalanopsis</i>	<i>Cyclobalanopsis</i> (gen.)	<i>Q. subg. Cyclobalanoides</i>	<i>Q. subg. Cyclobalanopsis</i>

Fig. 1 – principali suddivisioni del genere *Quercus*, con riferimenti bibliografici.

1.4 *Querce del gruppo Ilex*

Quercus ilex L.

Il Leccio è una specie tipica dell'ambiente mediterraneo distribuita dalle coste dell'Anatolia, all'Italia (diffusa principalmente nelle isole e nelle regioni costiere tirreniche e ioniche), alle coste atlantiche della penisola Iberica, Francia, fino al Marocco ed Algeria (Fig.2). In termini di distribuzione spaziale, la specie è più importante nella parte centrale ed occidentale del bacino del Mediterraneo, dove le foreste di leccio hanno una elevata importanza biologica e conservativa (Romane and Terradas 1992), che nella parte orientale dove è rara ed in nessun luogo dominante (Menitsky 2005). La specie ha una grande ampiezza ecologica, di solito associata ad una marcata variazione morfologica (eterofillia, forme arbustive). Cresce in quattro bioclimi (sensu Emberger): semiarido, arido, sub-umido e umido. Tuttavia è essenzialmente nel bioclina sub-umido che la specie occupa la più ampia gamma di ambienti, da quelli freddi a quelli caldi, con substrati che variano dai 0 a 2500 m s.l.m. a seconda della latitudine della regione in cui si trova (Barbero et al. 1992).

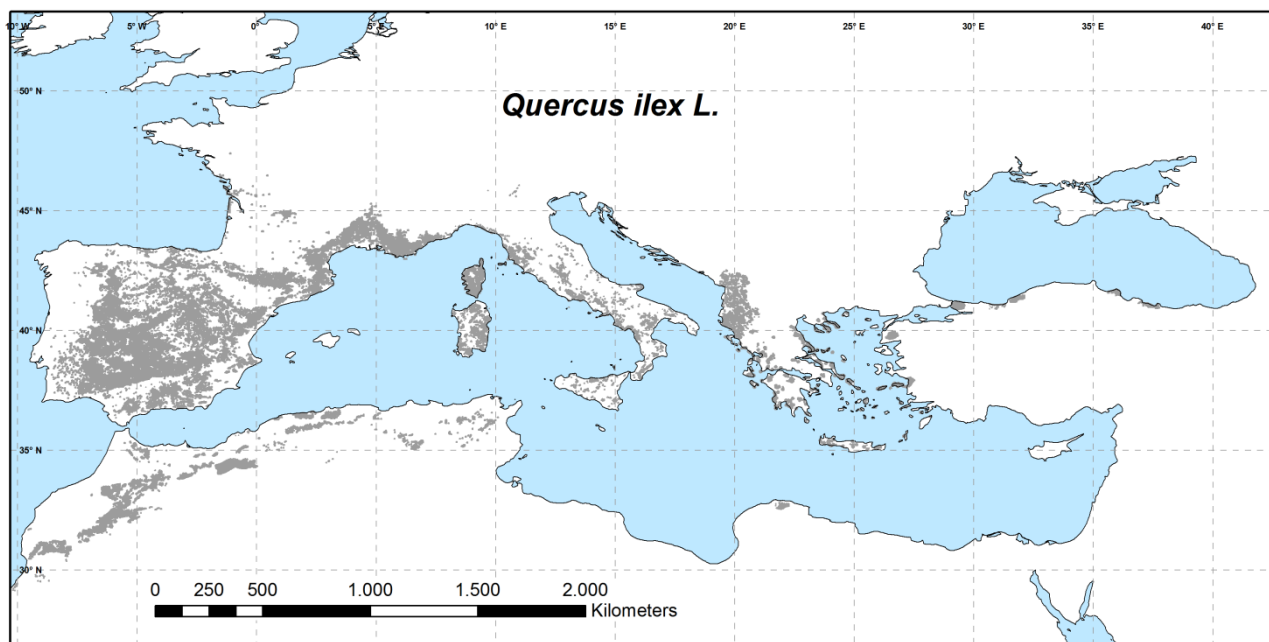


Fig. 2 - Areale di *Quercus ilex* L.

È un albero di medie dimensioni (fino a 30 m), foglie dure e coriacee tipico esempio di sclerofillia, dovuti ad adattamenti ad ambienti poco piovosi (Fig.3a-b). Si adatta a tutti i tipi di terreno ma predilige quelli acidi e ben drenati, non sopportando i ristagni di umidità. Ad accrescimento lento e longevo, arriva anche a mille anni di età. Nella penisola iberica ed in Nord Africa, viene spesso differenziata una sottospecie, *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (syn. *Q. rotundifolia* o *Q. ballota*). Questa si differenzia per la forma delle foglie (arrotondata vs. allungata), per avere ghiande lunghe fino a 2,5 cm dal sapore dolce, ed essere particolarmente adatta alle condizioni di xeromorfismo più accentuate.

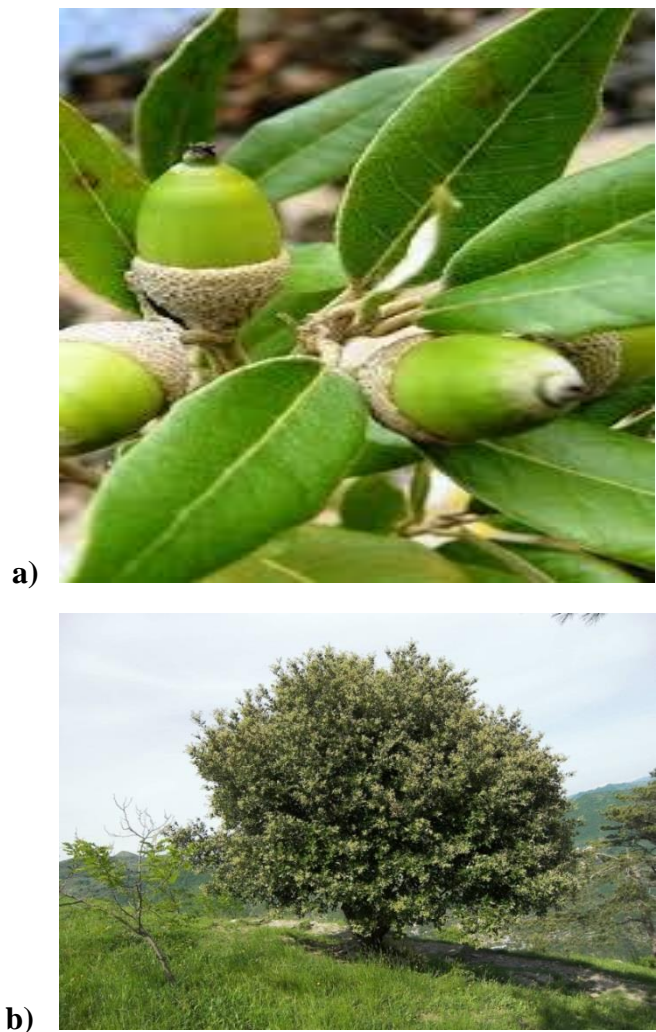


Fig. 3 – a) dettaglio foglie e b) portamento di *Quercus ilex* L

Quercus coccifera L.

È un arbusto a foglie sempreverdi diffuso nelle zone più aride del bacino del Mediterraneo fino alle coste del Mar Nero (Fig.4). Comunemente chiamata “quercia spinosa” (per le caratteristiche delle foglie), può presentarsi come un arbusto o un piccolo albero sempreverde che a maturità raggiunge i 4-6 m di altezza (Fig.5a-b). È l’unica a possedere un areale circummediterraneo (Barbero et al. 1992) ed è considerata un indicatore del climax delle foreste meso e termo-mediterranee e delle formazioni della macchia del bacino insieme a *Quercus ilex*. Diventa dominante in condizioni xerofile e di aridità grazie alla caratteristica di forte adattamento a terreni sfavorevoli (Menitsky 2005) prediligendo però suoli poveri e calcarei.

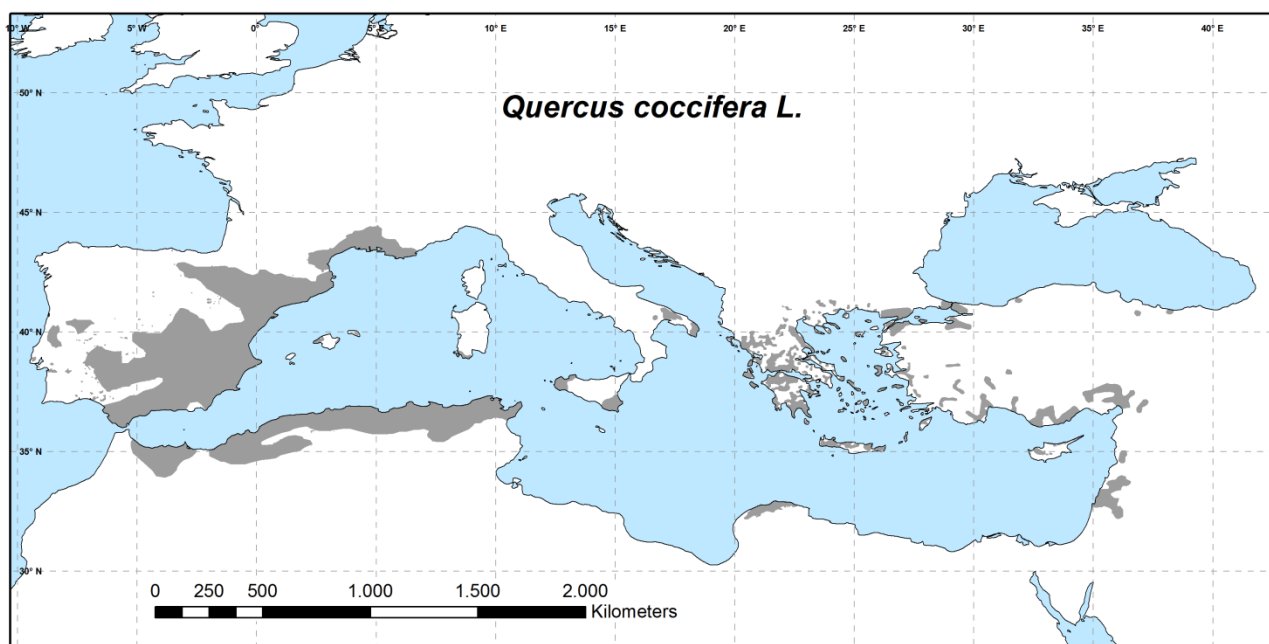


Fig. 4 - Areale di *Quercus coccifera* L

È una pianta molto longeva, eliofila ed estremamente frugale, con foglie persistenti per più anni, coriacee, brevemente picciolate, glabre su entrambe le pagine e con pochi peli sparsi lungo le nervature principali. Su questa specie si è infeudato un insetto appartenente alla famiglia delle cocciniglie, il *Chermes vermilio* (da ciò il nome specifico di coccifera), dalle cui femmine, essiccate e polverizzate, si estraeva fin dai tempi degli antichi Fenici un colorante rosso scarlatto per le stoffe. *Quercus coccifera* è strettamente legata alla *Quercus calliprinos* (Webb) nota come la quercia della

Palestina. È nativa delle regioni orientali del Mediterraneo, cresce in tutto il Medio Oriente dal nord dell'Algeria alla Turchia orientale. I rami giovani ed i germogli sono ricoperti da un fitto indumento di peli giallastri e possono arrivare a raggiungere i 20 m di altezza. In passato questa entità era considerata una specie a sé, ma ad oggi è considerata invece un morfotipo di *Quercus coccifera*.

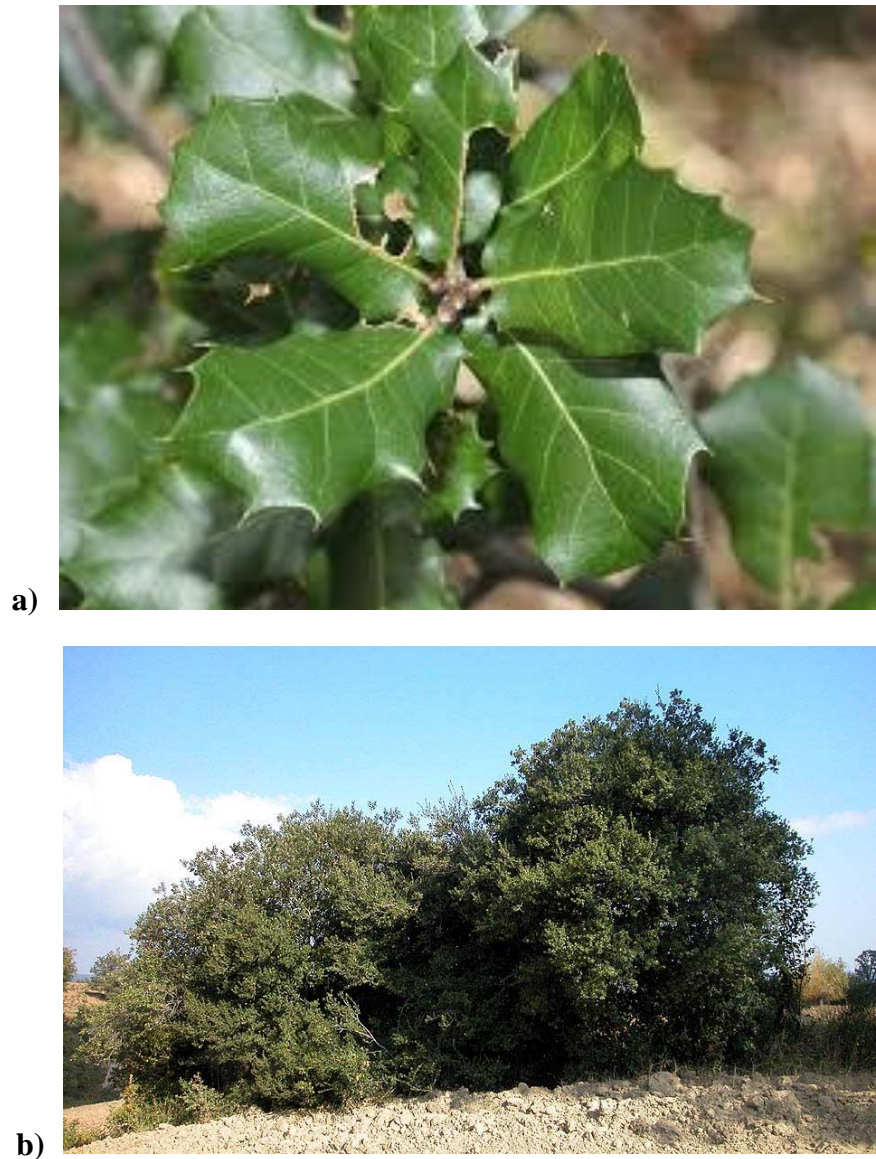


Fig. 5 – a) dettaglio foglie e b) portamento di *Quercus coccifera* L

Quercus alnifolia Poech

Endemismo dell'isola di Cipro, è un alberello che in condizioni favorevoli può arrivare a 8-10 m di altezza, ha foglie arrotondate o leggermente obovate, sopra verde lucido, sotto giallastre e pubescenti (Fig.7a-b). Il suo *range* è circoscritto all'isola di Cipro (Monti Troodos) ed è presente principalmente su rocce ignee ultrabasiche dai 400 a 1800 m s.l.m. formando boschi puri o misti e macchia mediterranea. In quest'area forma dense coperture estremamente intricate e difficili da percorrere. Ha un ruolo importante nella protezione del suolo da frane e dall'erosione. Secondo la Lista Rossa Mondiale delle querce è considerata vulnerabile (Oldfield & Eastwood 2007).

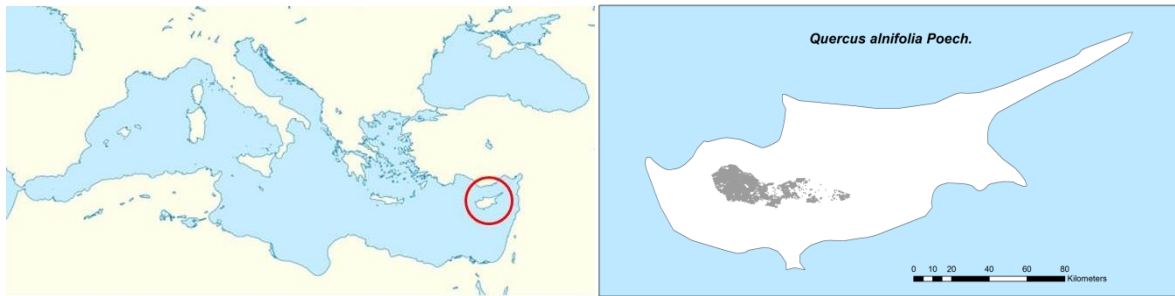


Fig.6 - Areale di distribuzione di *Quercus alnifolia* Poech



Fig.7 - a) dettaglio foglie e b) portamento di *Quercus alnifolia* Poech

Quercus aucheri Jaubert & Spach

Pianta che vive sulle isole turche, a volte fin sulla costa, è un alberello o che può arrivare fino ad un massimo di 5 m di altezza. Predilige suoli mediamente argillosi ed è indifferente all'acidità. Eliofila e scarsamente sciafila, ha foglie sempreverdi, coriacee, oblunghe o largamente ovate, simili a quelle di *Q. coccifera*, glabre nella pagina superiore o, alle volte, leggermente tomentose. Densamente tomentose, invece, nella pagina inferiore e con apice arrotondato (Fig.9a-b).

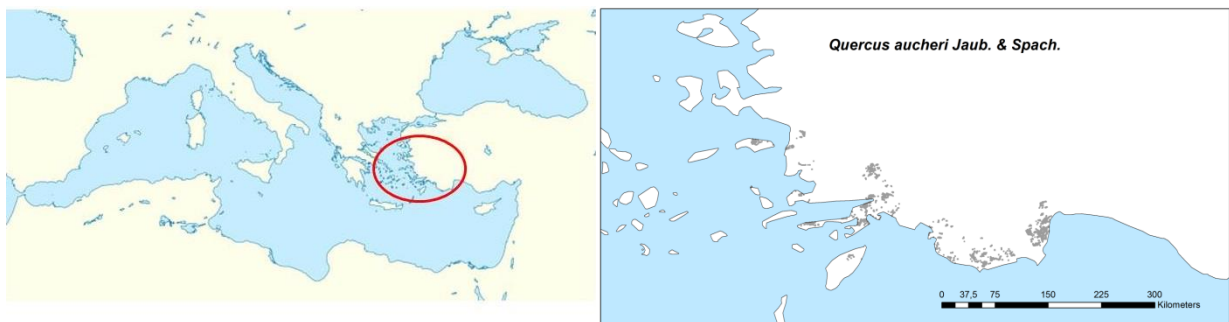


Fig. 8 - Areale di distribuzione di *Quercus aucheri* Jaubert & Spach



Fig. 9 - a) dettaglio foglie e b) portamento di *Quercus aucheri* Jaubert & Spach

1.5 *Querce a rischio di estinzione*

Le querce sono da sempre di globale importanza ecologica ed economica, ed hanno un grande valore simbolico per molti paesi. Esse sono state fonte di legname per secoli e continuano ancora oggi a fornire una elevata quantità di legno per produzioni industriali. Altri prodotti di derivazione delle querce includono il carbone, medicinali, coloranti, sughero e corteccia utilizzati per la concia delle pelli. Le ghiande hanno fornito nutrimento in tempi di carestia e continuano oggi ad essere utilizzate come foraggio per gli animali. La loro importanza dal punto di vista naturalistico ed ecosistemico è enorme.

La più grande diversità di specie di querce la troviamo in Messico con circa 160 specie, delle quali 109 sono endemiche del paese. Qui, esse sono una componente dominante della biodiversità sia delle foreste montane sia delle foreste di pianura e sono tra gli alberi più importanti per il sostentamento rurale (Valencia 2004).

Un secondo centro di diversità di querce lo troviamo in Cina con oltre 100 *taxa*. Zhou et al (2001) evidenziano che le querce svolgono un ruolo importante nel provvedere alla stabilità e protezione del suolo e dei pendii soprattutto nelle aree di montagna, ma queste specie hanno anche una notevole importanza a livello ecologico nella successione e nello sviluppo delle comunità vegetali e nel sostentamento, grazie alla raccolta di legname, carbone e produzione di medicinali e coloranti.

In tutto il mondo però molte specie di querce sono ormai oggi a rischio di estinzione. Negli ultimi 200 anni grandi aree di boschi di querce sono state cancellate, sugli altipiani del Messico, America centrale e a nord delle Ande, per far spazio a piantagioni di caffè e allevamento del bestiame, per non parlare del loro continuo sfruttamento per le risorse legnose, carbone e cambiamenti di uso del suolo (Kappelle 2006-b). Negli Stati Uniti, interi ecosistemi di querce sono diminuiti per cause ancora non del tutto conosciute, ma fattori contributivi sono stati sicuramente i gravi incendi subiti, l'aumento del consumo di ghiande, il pascolo di erbivori che si nutrono delle piccole plantule, ed i cambiamenti climatici. Inoltre le pratiche di gestione in molte foreste hanno portato alla sostituzione delle foreste da legno duro con piantagioni di conifere, e questo ha causato l'introduzione di specie invasive di insetti, funghi e patogeni come *Phytophthora ramorum* che provoca la morte improvvisa delle querce. Negli Stati Uniti le querce presenti sono state gravemente colpite da questo agente patogeno, mentre in Messico ne ha provocato la morte in molte zone.

Il rapporto dello IUCN presenta i risultati di una valutazione globale dello stato di conservazione di tutte le specie del genere *Quercus* con una generale eccezione per gli ibridi. Tuttavia, per oltre la metà delle specie, si è rivelato impossibile raccogliere informazioni sufficienti che permettessero di

valutarne lo stato di pericolo e sono così definite “Data Deficient” (vedi Tab.1). In totale ci sono circa 500 *taxa* del genere, e su 208 di questi sono stati applicati i criteri e le categorie per la valutazione delle Lista Rossa dello IUCN.

Le informazioni sulla distribuzione e l’abbondanza delle specie vegetali minacciate è quindi di primaria importanza nella progettazione e implementazione della conservazione attiva della biodiversità. C’è necessità quindi di focalizzare l’attenzione sulle specie rare e minacciate riconosciuta nell’ambito degli obiettivi e meccanismi delle principali convenzioni internazionali sulla biodiversità ed in particolare nella Convenzione sulla Diversità Biologica (CBD) e c’è necessità di intervenire con urgenza sulle specie criticamente minacciate ed in via di estinzione. Molte di queste vengono oggi coltivate in alcuni giardini botanici di Europa, America ed Asia, fornendo così una base per la ricerca e la futura reintroduzione nell’ambiente naturale. È da sottolineare tuttavia che queste specie potranno essere reintrodotte efficacemente solo se anche i loro habitat naturali saranno mantenuti al sicuro. Allo stesso tempo, studi di valutazione dello stato delle loro risorse genetiche sarebbero altamente necessari.

Conservation Status	Number of oak taxa
Extinct	0
Critically Endangered	13
Endangered	16
Vulnerable	27
Near Threatened	22
Data Deficient	33
Not Evaluated	ca.300
Least Concern	97

Tab.1 – Sintesi dei risultati di valutazione di querce a rischio estinzione (Oldfield & Eastwood 2007)

Tra le specie oggetto del nostro studio, *Quercus alnifolia* e *Quercus aucheri* sono considerate ad oggi Vulnerabili.

1.6 *Cambiamenti climatici e impatti sulle foreste*

La conoscenza dei potenziali effetti dei cambiamenti climatici sulle foreste europee è in continua espansione e sono stati evidenziati ed osservati, da ormai oltre venti anni di ricerche, cambiamenti nella crescita, mortalità per siccità e di distribuzione delle specie (Lindner et al. 2013). Nonostante i continui studi, seppure limitati a causa della mancanza di risorse, e quindi spesso concentrati su determinati scenari dei possibili cambiamenti climatici anziché soffermarsi su una visione più ampia e complessa, esistono grandi lacune su come questi cambiamenti ed i loro impatti sulle foreste possano essere interpretati nelle diverse regioni del pianeta, rendendo così difficile delineare linee di gestione appropriate, soprattutto a livello locale.

Generalmente le nostre foreste non rispondono in maniera lineare alle variazioni dei parametri climatici come precipitazioni e temperatura annuale, ed i modelli climatici di simulazione utilizzati (Fig.10), che spesso indicano un aumento della produttività e dello stock di carbonio, variano molto dal livello regionale a quello globale. Molte possibili risposte delle foreste si sono avute solo con la proiezione di grandi eventi climatici estremi, causando così ancora più incertezza sulla valutazione delle risposte “reali” e gradualmente degli interi ecosistemi, soprattutto a livello micro-regionale. Recentemente l’Organizzazione Meteorologica Mondiale ha pubblicato una relazione sugli eventi estremi di rilevante importanza nel decennio che va dal 2001 al 2010 (WMO, 2013). Il 2003 è stato interessato da una grande siccità che ha visto la più bassa concentrazione di precipitazioni in cinque mesi; mentre il 2010 è stato interessato da altissime temperature che hanno provocato la perdita di oltre un milione di ettari di bosco a causa di incendi. In generale, ci si aspetta che le situazioni con precipitazioni e temperature estreme aumenteranno sempre di più (Senevirante et al. 2012), sebbene il loro potenziale per influenzare le foreste rimanga ancora di difficile previsione.

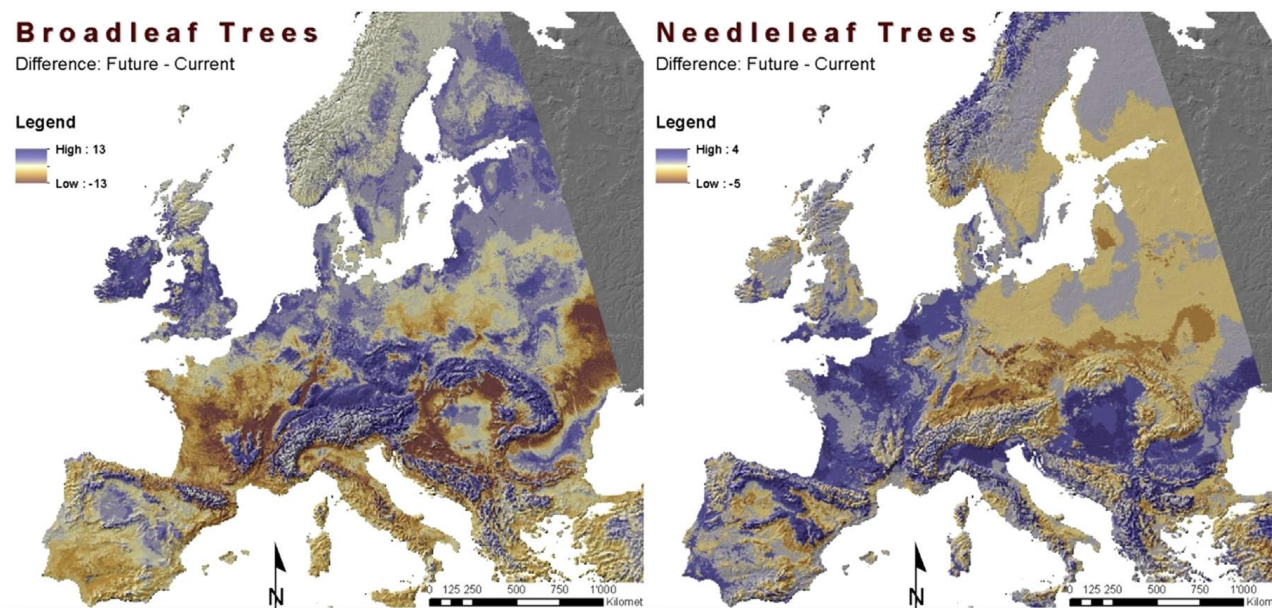


Fig. 10 – Cambiamenti nella ricchezza di specie arboree a seguito di proiezioni di modelli di cambiamenti climatici dal 1961 al 1990 (sinistra) e proiettato nel futuro dal 2071 al 2100 (destra). (Lindner et al. 2013)

In generale, i principali impatti previsti sulle foreste europee sono: variazioni di crescita e di produttività; maggiore tendenze al disturbo, migrazione ed estinzione. Nel corso del XX secolo la produttività delle foreste era in positivo, ad eccezione delle aree con bassa disponibilità di acqua o basso livello di azoto nel terreno (es. regioni boreali) (Boisvenue e Running 2006; Kahle et al. 2008; Spiecker et al. 1996). Ad oggi, gli studi condotti evidenziano effetti negativi sulla crescita e vitalità di alcune importanti specie arboree come il Faggio (*Fagus sylvatica* L.) per il quale l'aumento di gravi periodi di siccità ne ha ridotto la crescita dell'area basale del 5% dal 1987 al 2004 (Bontemps et al. 2009, 2010). Così allo stesso tempo, si è riscontrato uno spostamento altitudinale e latitudinale di specie arboree che dipenderà sempre dalla relativa efficacia di dispersione del seme delle diverse specie (Vai et al. 2009) e si è notato come in molte aree il Faggio si sia andato a sostituire al Leccio (*Q. ilex* L.); questo ultimo, invece, ha lentamente colonizzato le foreste delle aree atlantiche del contr-nord Europa a partire dal 1900. L'adattamento delle specie ai cambiamenti climatici porta di conseguenza alla selezione di nuovi genotipi, influenzati dal grado di isolamento genetico e dalle strategie di dispersione del polline o dei semi (Savolainen et al. 2007; Ghannoum & Way 2011). Un esempio di questa evoluzione locale sono alcuni popolamenti di *Pinus sylvestris* L. in Spagna e Italia (negli Appennini), che hanno sviluppato nuove strategie per far fronte ad eventi climatici estremi come siccità ed aridità e vengono considerate ad oggi risorse preziose nei programmi di riproduzione per l'aumento della tolleranza agli stress (Màtyàs et al. 2009). Di contro, molti modelli di simulazione hanno stimato l'alta probabilità di locali estinzioni

delle specie, soprattutto quelle che riescono a tollerare cambiamenti climatici graduali e non drastici (Burger e Lynch 1995). Gli eventi di disturbo sono invece difficili da etichettare come diretta conseguenza dei cambiamenti climatici, ma proprio gli effetti di questi cambiamenti risulteranno evidenti nell'aumento di frequenza e intensità di questi. Per esempio in Svizzera è stato dimostrato un forte aumento delle raffiche di vento a partire dal 1993 (Usbeck et al. 2010). Gli impatti dei disturbi sulle foreste sono però influenzati sia dalle variabili metereologiche sia dallo stato delle foreste stesse (Seidl et al. 2011a, b), e negli anni sono stati infatti studiati vari indici per riassumere le variabili climatiche più rilevanti (Holsten et al. 2013). In Europa l'indice più usato è il Canadian Index Fire Weather (Van Wagner 1987) utilizzato per proiettare sul futuro i dati climatici e ottenere indicazioni sui possibili cambiamenti. Tutti questi studi indicano chiaramente un aumento dei livelli di pericolo da incendio soprattutto in Francia (Chatry et al. 2010) Portogallo (Carvalho et al. 2011) ed il bacino del Mediterraneo nel suo complesso (Moriondo et al. 2006).

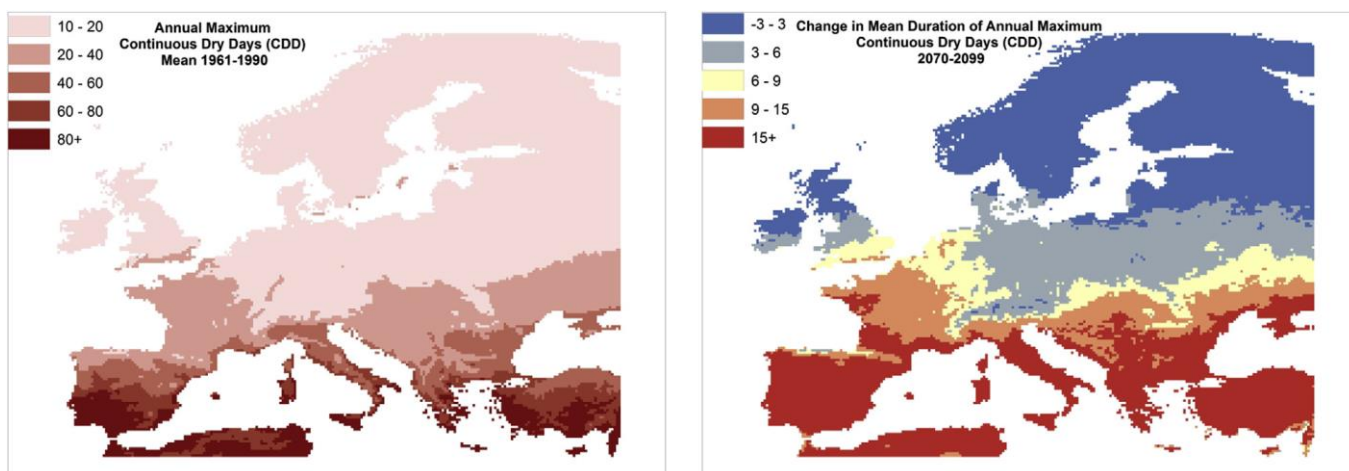


Fig.11 – Media massima annuale delle giornate aride continue dal 1961 al 1990 (sinistra) e la variazione prevista nel futuro dal 2070 al 2099 (destra)

Le sempre più frequenti ondate di calore inducono ad una senescenza precoce, ad un accorciamento del periodo vegetativo e perdita di superficie fotosintetica (Fig.11). Nel 2003 una forte defogliazione in numerosi faggi europei ha portato una massiccia riduzione dell'indice di area fogliare (LAI) (Breda et al. 2006). Alcune specie decidue non hanno mostrato effetti notevoli (es. le querce), le sempreverdi invece, come le conifere, ne hanno risentito per diversi anni (Lasermann & Brauning 2011). Gli effetti prolungati degli stress portano ad un aumento della mortalità, nonché a modifiche nelle strutture forestali come la riduzione della densità (Giuggiola et al. 2013).

L'aumento di calore e della siccità estiva non sono però le uniche minacce. Infatti preoccupante è anche l'aumento delle piogge invernali che possono esporre le specie arboree a condizioni di ipossia che provocano danni sulle radici, rendendole più vulnerabili alla siccità estiva e alle forti raffiche di vento ormai sempre più in aumento (Usbeck et al. 2010; Parelle et al. 2007, 2010; Kreyling 2010). Ulteriore minaccia sono gli inverni troppi miti e la variazione nella permanenza del manto nevoso nelle regioni dell'Europa centrale e settentrionale, dove il germogliamento delle specie caducifoglie è regolato proprio dalla somma dei giorni freddi invernali (necessari per la vernalizzazione) e dalla somma dei giorni caldi a fine inverno e primavera. I cambiamenti climatici influiranno anche sul rischio di focolai di malattie da insetti sia direttamente, attraverso effetti sulla crescita della popolazione, sia indirettamente, modificando la vitalità degli alberi. Dato che gli insetti sono organismi poichilotermi (ovvero organismi la cui temperatura corporea interna varia notevolmente come conseguenza della variazione di temperatura dell'ambiente esterno), il riscaldamento globale prevede un miglioramento del loro tasso di crescita e sopravvivenza con un conseguente aumento del numero di esemplari (Robinet e Roques 2010). Altri danni potranno essere causati, ad esempio, dagli Scolitidi, in parallelo con l'aumento degli stress idrici (Jactel et al., 2012). Il monitoraggio su larga scala e a lungo termine delle condizioni delle foreste europee ha quindi ormai un ruolo importante per la valutazione delle conseguenze ecologiche dell'ambiente e degli impatti previsti. L'inventario forestale più completo di informazione sullo stato di salute delle foreste è previsto dal programma ICP Forest (Meining e Fischer, 2011). Questo programma sta mettendo in evidenza come i rapidi cambiamenti climatici combinati con la frammentazione delle foreste e la presenza di barriere antropiche (strade, aree urbanizzate ecc.) (Resco de Dios et al. 2007) possono costituire un ostacolo insormontabile per l'evoluzione spontanea della foresta. I problemi legati alla gestione di queste foreste sotto i cambiamenti climatici sono ormai da anni affrontati da molti ricercatori e sono state utilizzate diverse strategie selvicolturali. In Europa queste si basano principalmente su rimboschimenti, tecniche per aumentare la resilienza (la capacità dell'ecosistema di assorbire perturbazioni e rimanere in gran parte invariato) e promuovere la restaurazione delle comunità naturali. Bolte et al. (2007, 2009) propongono di promuovere l'uso di un'alta variabilità fenotipica e genotipica del materiale riproduttivo. Come già accennato, gli impatti dei cambiamenti climatici saranno diversi a seconda della geografica, distribuzione e caratteristiche ecologiche delle specie. Quelle endemiche o relitte, con una gamma ristretta di variabilità genetica, saranno probabilmente le più minacciate e richiederanno una maggiore protezione e gestione attiva. Senza un'azione politica rapida i cambiamenti climatici porteranno a gravi conseguenze. Gli adattamenti necessari sono difficili da progettare e pianificare poiché da un lato le foreste si trovano ad affrontare cambiamenti graduali, come le variazioni nella produttività, e dall'altro sono sempre più esposte ad

eventi estremi come l'aumento del rischio di incendi, siccità e la diffusione di malattie e parassiti. La pianificazione di strategie di adattamento che possano aumentare la resilienza dei nostri ecosistemi forestali sembra quindi essere molto complessa e impegnativa (Lidner et al. 2013).

1.7 *Ecoregione mediterranea*

Il bacino del Mediterraneo è una delle più ricche e complesse regioni sulla terra, geologicamente, biologicamente e culturalmente. Si tratta di un mosaico in continuo movimento e trasformazione dove troviamo più di una dozzina di maestose catene montuose, boschi e foreste estremamente variabili e diversificati, zone ripariali e arbustive, zone costiere ed umide, ed il mare stesso con i suoi arcipelaghi formati da migliaia di isole. Ma se i fattori geofisici, climatici, storici ed ecologici hanno contribuito in gran parte alla diversità ecologica e biologica della regione, il peso del fattore umano, oggi come nel passato, è stato molto più determinante qui che in tutto il resto del mondo. Per comprendere meglio la biodiversità del Mediterraneo è necessario esaminare come e quando si sono sviluppate, nel corso delle ere geologiche, le principali caratteristiche fisiche della regione. Circa 250 milioni di anni fa, alla fine dell'era Paleozoica, le terre emerse di tutto il mondo erano riunite in un unico grande super continente chiamato Pangea. All'inizio del Giurassico (ca. 200 milioni di anni fa) la Pangea ha cominciato a fratturarsi in due continenti più piccoli: l'Eurasia a nord e la Gondwana a sud. Questi due continenti sono stati separati durante tutto il Triassico da un oceano chiamato Tetide che in seguito ha cominciato a trasformarsi, a causa del movimento verso nord della Gondwana e la sua collisione con l'Eurasia. Successivamente, tra il Giurassico (165 milioni di anni fa) ed il Cretaceo (120 milioni di anni fa) l'espansione del fondale marino ha creato l'attuale Oceano Atlantico, che ancora oggi divide l'Africa ed il nord America, e l'ancestrale Mar Mediterraneo tra Africa ed Eurasia. Infine la Tetide si è chiusa definitivamente durante il Cenozoico, circa 65 milioni di anni fa, quando i vari frammenti della Gondwana, tra cui India e penisola araba, si sono scontrati con il resto dell'Eurasia, ed i suoi antichi resti non sono altro che l'attuale Mar Mediterraneo, ed i più piccoli Mar Nero e Mar Caspio così come li conosciamo noi oggi (Rosenbaum et al. 2002; Thompson 2005).

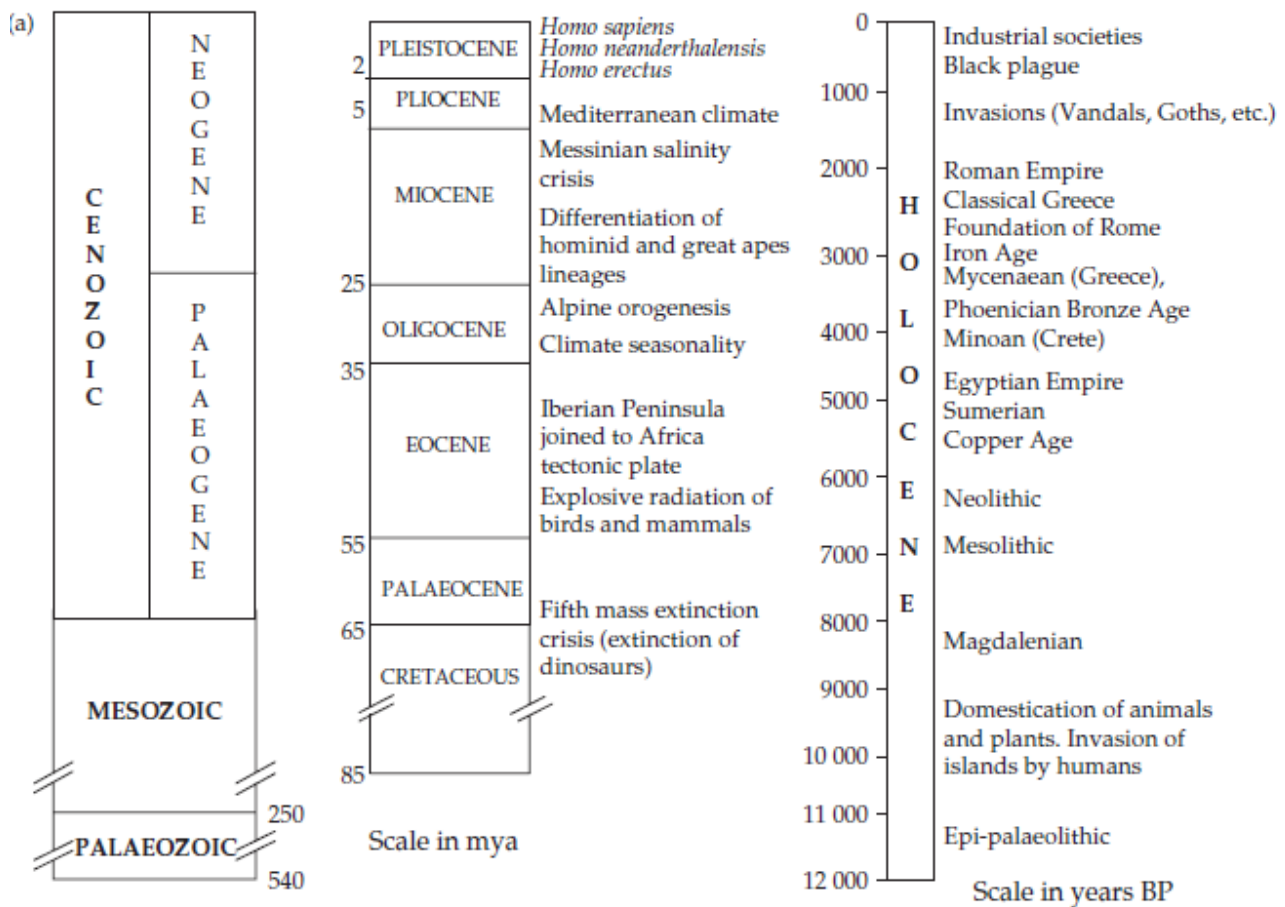


Fig. 12 – Sinossi di alcuni principali eventi fisici e storici nel Mediterraneo

Dall'inizio del terziario però, la storia del Mediterraneo è diventata più complicata e costituita principalmente dall'isolamento di diverse (micro-)placche e dai loro movimenti: tra queste, le più importanti sono state la micro-placca Iberica, quella Pugliese (che comprendeva l'Italia sud-orientale, la Grecia ed i Balcani), e la micro-placca Cyrno-Sarda (Biju-Duval et al 1976; Rosenbaum et al. 2002a; Papazachos e Papazachou 2003). La micro-placca Iberica ha svolto un ruolo di fondamentale importanza nell'evoluzione della regione, a causa della sua posizione tra l'Africa e la placca euroasiatica. Infatti, nel tardo Oligocene (28 milioni di anni fa), un movimento verso sud-est della placca africana rispetto a quella europea ha causato la rotazione di quest'ultima, che comprendeva tutte le grandi isole del Mediterraneo occidentale e diversi blocchi che sono stati collegati successivamente o alla placca africana o a quella euroasiatica, e successivamente la micro-placca Cyrno-Sarda ha cominciato a ruotare verso sud-est causando l'apertura del bacino delle Baleari. Queste dinamiche hanno avuto conseguenze importanti sugli endemismi e le differenziazioni di piante e animali ed hanno anche aiutato a provocare le frequenti attività sismiche

e vulcaniche in varie parti della regione. Inoltre, l'incontro e la collisione tra la placca africana e quella euroasiatica ha avuto come conseguenza importante la formazione di un anello di catene montuose in tutto il bacino del Mediterraneo (ad eccezione della zona tra Tunisia ed Egitto) (Fig.13), e la conseguente creazione di una elevata varietà paesaggi sia terrestri che marini.



Fig. 13 – Delimitazione dell'area biogeografica Mediterranea con le sue principali catene montuose

Un periodo di breve durata ma cruciale che ha seguito la collisione tra l'Africa e l'Eurasia nel Mediterraneo, si è verificato nel tardo Miocene ed è stato chiamato “Crisi salina del Messiniano” (Duggen et al. 2003). Questo è oggi considerato uno degli aspetti geologici più spettacolari in tutto il Cenozoico, quando il mar Mediterraneo si è prosciugato quasi completamente ed è diventato un deserto di terre ipersaline. L'evento ha avuto origine circa 5 milioni di anni fa e si è concluso bruscamente 630 mila anni più tardi (Krijgsman et al. 1999; Rouchy & Caruso 2006) ed è venuto alla luce recentemente, grazie a ricercatori incuriositi dalla presenza di enormi depositi di sale (o evaporiti), nei pressi di Sicilia, Calabria e Nord Africa. La crisi di salinità del Messiniano ha provocato anche ripercussioni sia a nord che a sud del Mediterraneo, provocando grandi terremoti che scossero il suolo, riattivando antichi vulcani e causandone la formazione di nuovi. Durante questo periodo, alcuni grandi fiumi, come ad esempio il Rodano ed il Nilo, hanno continuato ad

alimentare un Mediterraneo quasi del tutto prosciugato, scavando gradualmente profonde gole sulla spessa roccia granitica e sui blocchi calcarei dei bordi costieri. Ad esempio, una di queste gole si trova a 900 m sotto il livello del mare, alla foce del fiume Rodano, vicino Marsiglia, mentre un'altra si trova a 2000 m sotto la città del Cairo. Gli ecosistemi forestali e gli areali di tante specie vennero letteralmente sconvolti da questa fase, che ebbe enormi ripercussioni ecologiche e provocò l'emersione di diverse terre che congiunsero i diversi continenti affacciati sul Mediterraneo. Ulteriori vicissitudini di questa area sono cosituite dall'instaurarsi del clima Mediterraneo (nel Pliocene, circa 3,5 milioni di anni fa) e dalle glaciazioni che hanno interessato tutto l'emisfero nord a più riprese, a partire dal Pleistocene (circa 2,5 milioni di anni fa).

Ad oggi, l'Ecoregione Mediterranea è un'area molto vasta che comprende una grandissima varietà di ambienti dalle coste Atlantiche del Marocco e delle Isole Canarie, sino all'Anatolia orientale e alle steppe del Medio Oriente ed ha una superficie totale di 2.300.000 km² (Fig.14). Possiede una varietà di paesaggi incredibilmente elevata, come già detto in precedenza, se si considera la sua estensione, con una flora che comprende circa 24.000 specie delle quali il 60% sono endemiche (Greuter 1991), mentre, differentemente, l'Africa ha una ricchezza totale di 30.000 *taxa* in una superficie ben quattro volte più grande (Médail e Quézel 1997). Rispetto alle latitudini più elevate, l'80% di tutte le specie endemiche di piante europee sono del Mediterraneo (Wiens 2004), e questa ricchezza è attribuita alla già citata serie di fattori (storia paleoclimatica e paleogeografica, eterogeneità ecogeografica). La presenza di rilievi montuosi che raggiungono i 3.000 m (il Gran Sasso con i suoi 2.914 metri s.l.m.), le pianure, i piani collinari e gli oltre 8.000 km di coste rocciose e sabbiose consentono una grande diversità di habitat. La presenza di questi, distribuiti in diverse combinazioni e stadi strutturali, donano al paesaggio dell'Ecoregione mediterranea quelle particolari caratteristiche a mosaico che lo distinguono e lo rendono così tipico rispetto a molte zone temperate del nord Europa o rispetto alle aride o umide zone tropicali. L'Ecoregione mediterranea costituisce quindi uno degli *hotspot* di biodiversità più importanti del mondo (Myers et al. 2000). Nonostante le numerose ricerche effettuate sia nel settore faunistico che in quello vegetazionale, per conservare e gestire al meglio questo biota, si ha ancora bisogno di aumentare le nostre conoscenze sulle caratteristiche principali, la vera estensione e le forze che hanno governato la sua biodiversità. Il fine ultimo è quello di comprendere l'impatto passato, ed anticipare quello futuro, delle caratteristiche ambientali sulla diversificazione ed evoluzione della specie (Médail and Diadema 2009).

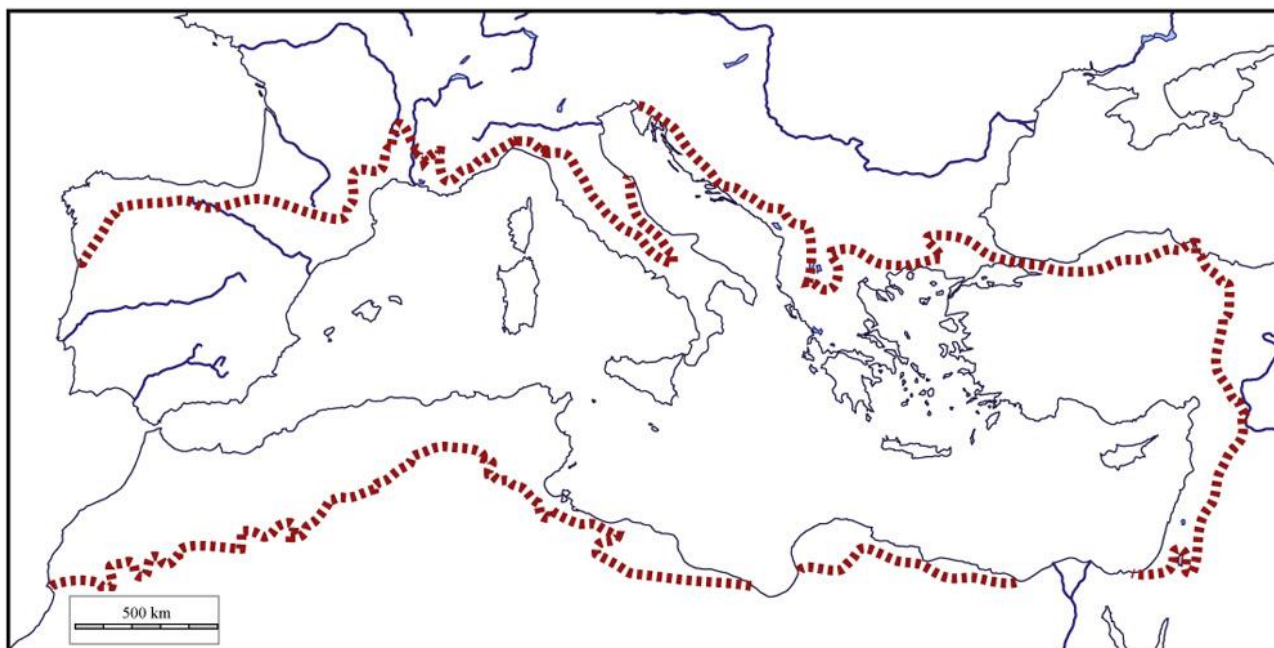


Fig. 14 – Delimitazione della regione del Mediterraneo in base a criteri bioclimatici (Quézel e Médail 2003)

Rifugi glaciali

I rifugi glaciali rappresentano aree climaticamente stabili, le cui posizioni sono state determinate da fattori storici, climatici e orografici, e che costituiscono settori chiave per la conservazione e persistenza a lungo termine delle specie e della diversità genetica, soprattutto in considerazione delle minacce rappresentate dai vasti processi dei cambiamenti ambientali operanti nella regione del Mediterraneo, in particolare a partire dal Messiniano (circa 5 milioni di anni fa). Il clima durante i cicli glaciali del Pleistocene, in particolare nel periodo freddo dell'ultima grande glaciazione (LGM), ha portato a riorganizzare interi ecosistemi, alterando le specie ed i modelli di distribuzione della biodiversità (Davis 1976; Huntley & Webb 1989). Sulla base di questo scenario, alcune località hanno funzionato da rifugi climatici (Fig.15), preservando interi habitat e di conseguenza hanno permesso la sopravvivenza di molte specie forestali. In seguito, queste hanno ripreso ad espandersi non appena le condizioni climatiche sono migliorate (Provan & Bennett 2008; Keppel et al. 2012). Ad oggi, identificare un rifugio glaciale è considerato di importanza fondamentale per comprendere al meglio i vari modelli di distribuzione e gli adattamenti ecologici delle specie (Davis & Shaw 2001; Jansson & Dynesius 2002; Hewitt 2004; Petit et al. 2005). I fitogeografi, ad esempio, hanno ipotizzato che gli endemismi non siano altro che eredità di specie che hanno resistito alle condizioni climatiche avverse del Pleistocene grazie alla presenza esclusiva in pochi ed isolati rifugi glaciali (Gavin et al. 2014; Nieto Feliner 2014).

Ad oggi, nella regione bioclimatica mediterranea sono stati identificati ben 52 rifugi glaciali (33 situati nella parte occidentale del Bacino del Mediterraneo e 19 nella sua parte orientale) che hanno confermato l'importante ruolo rifugiale svolto dalle tre principali penisole mediterranee: iberica, italiana e balcanica (Médail & Diadema 2009). È da sottolineare inoltre l'importanza di nuove aree alle quali era stato precedentemente attribuito solo un ruolo minore, come le grandi isole del Mediterraneo, il Nord Africa e la Turchia

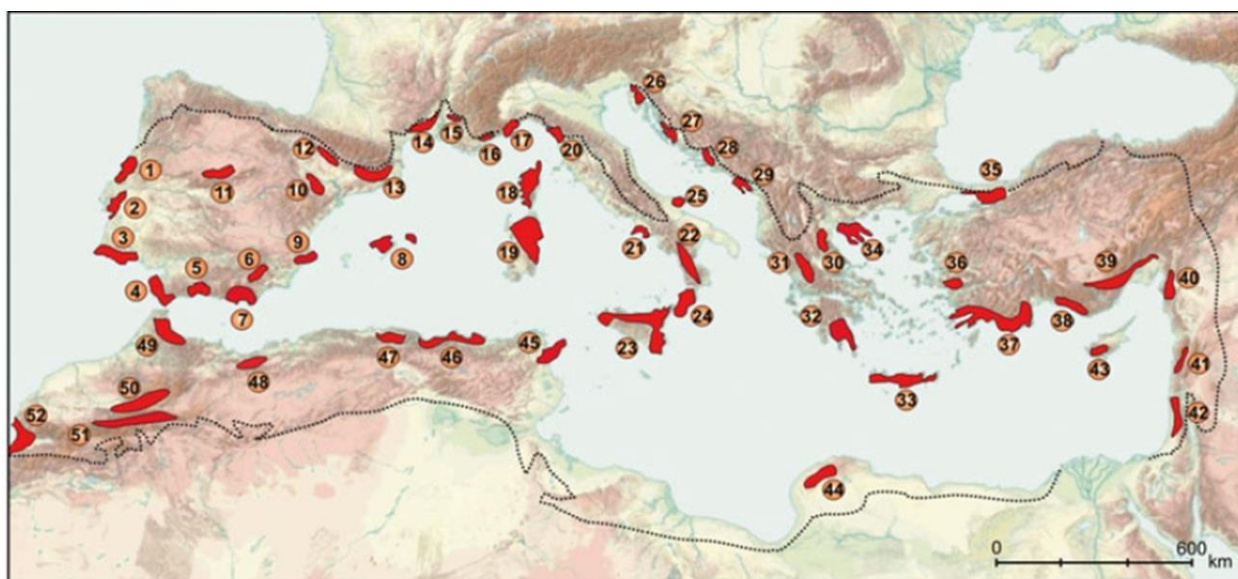


Fig. 15 – Ecoregione mediterranea e distribuzione geografica dei 52 rifugi glaciali (Médail & Diadema 2009)

Il ruolo degli stretti

Gli stretti hanno sempre giocato un ruolo fondamentale nel modellare la distribuzione filogeografica attraverso i mari. Questo ruolo non è inaspettato all'interno del bacino del Mediterraneo, la cui costa si estende per circa 46.000 km rendendo il mare una barriera geografica, non solo per lo scambio biologico tra le isole, ma anche tra la terraferma e le isole stesse o tra aree continentali. La posizione geografica degli stretti, la loro larghezza e la profondità del fondale marino sono tutti fattori cruciali per determinarne il ruolo biogeografico (Nieto Feliner 2014). All'interno del bacino del Mediterraneo possono essere identificati 9 stretti (Fig. 16) (Kadereitand Westberg 2007), tra i quali ha sicuramente grande importanza lo Stretto di Gibilterra, tradizionalmente considerato un forte ostacolo biogeografico per flora e fauna, al pari di catene montuose come Pirenei o le Alpi (Hewitt 2011). Infatti, sono caratteristici la concentrazione elevata di diversità vegetale su entrambi i lati dello stretto, l'accumulo di specie relitte, l'alta percentuale di endemismi, e la separazione

netta delle discendenze genetiche di diverse specie vegetali (Rodríguez Sánchez et al. 2008). I rapporti biogeografici tra le specie nei due lati del canale di Sicilia, invece, sono stati modellati dai frequenti spostamenti eustatici del livello del mare durante i periodi interglaciali del Pleistocene, che hanno di fatto facilitato lo scambio biotico tra la Sicilia, la Tunisia e le isole (Malta, Pantelleria, Lampedusa, l'arcipelago delle Eolie e le Egadi) (Naciri et al. 2010; Zitari et al. 2011; Lo Presti & Oberprieler 2011; Fernández-Mazuecos e Vargas 2011). Lo stesso avvenne anche per le isole Baleari, tra queste e la costa orientale della Spagna, (Molins et al. 2009), e nello stretto di Bonifacio tra la Corsica e la Sardegna (Falchi et al., 2009). Nel Mediterraneo orientale invece, le conoscenze sono minori; lo stretto del Bosforo si ritiene abbia agito come importante barriera geografica, come ad esempio per l'espansione costiera di due specie arbacee quali *Eryngium maritimum* L. e *Cakile maritima* Scop.

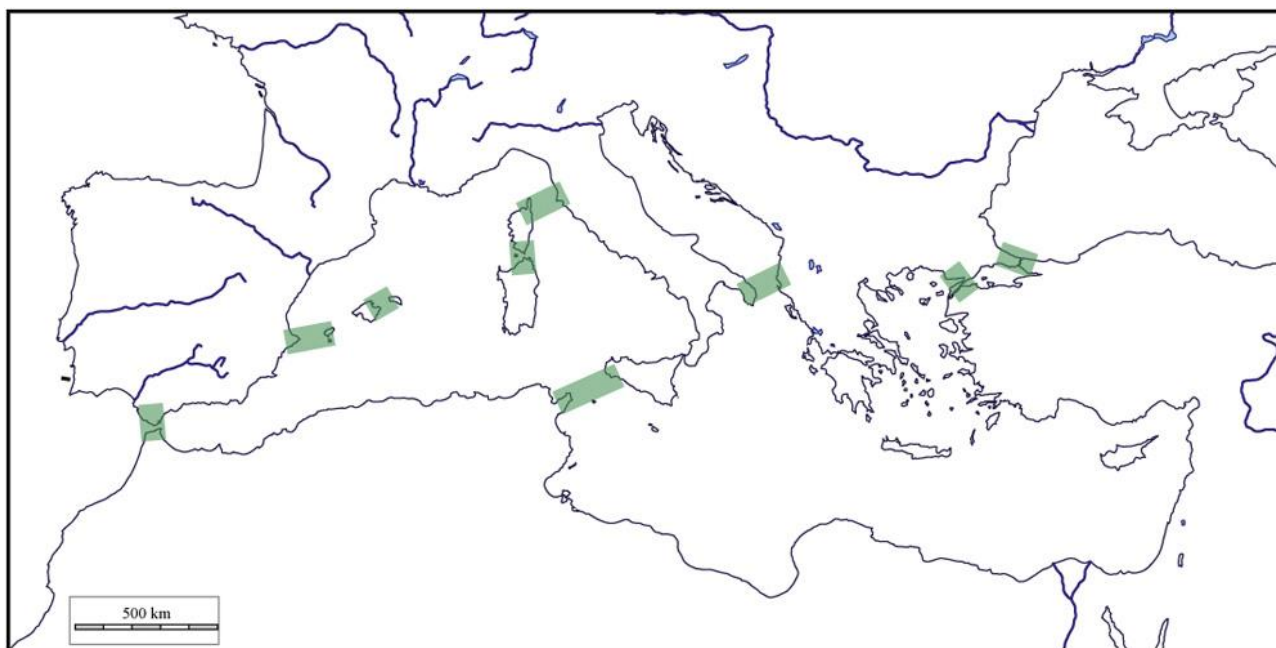


Fig. 16 – Stretti di mare mediterranei, il cui ruolo biogeografico come barriere e corridoi è stato affrontato in numerosi studi filogeografici su tutto il bacino

1.8 *La genetica del paesaggio e la filogeografia*

Landscape Genetics (genetica del paesaggio) è una nuova disciplina che mira a fornire informazioni su come le caratteristiche ambientali influenzino i processi micro-evolutivi, la genetica delle popolazioni, il flusso genico, la differenziazione genetica e l'adattamento delle specie a diverse scale spaziali e temporali (Balkenhol et al. 2009; Holderegger et al. 2008; Holderegger et al. 2010; Manel et al. 2003; Storfer et al. 2007). I passaggi chiave della Landscape Genetics sono l'individuazione delle discontinuità genetiche tra popolazioni e la correlazione tra queste discontinuità e le caratteristiche paesaggistiche ed ambientali. Quantificare l'influenza del paesaggio sul flusso genico fra le popolazioni permette di comprendere processi biologici fondamentali come la distribuzione delle specie ed il loro adattamento a differenti condizioni ambientali (Richmond et al. 2013) o la presenza di barriere geografiche che hanno determinato fenomeni di differenziazione genetica (Galpern et al. 2012; Manel et al. 2003). Le applicazioni possono anche interessare lo studio delle dinamiche di popolazione (Williams et al. 2007; Spear et al. 2008) contestualmente a scenari climatici presenti, passati e futuri (Orsini et al. 2008; Gugger et al. 2013). L'integrazione delle tecniche di analisi spaziale alla caratterizzazione genetica delle specie può fornire anche uno strumento nuovo ed accurato per valutare, ad esempio, *hotspot* di biodiversità genetica così come ambiti territoriali dove è elevato il rischio di perdita di aplotipi endemici (Escudero et al. 2003; Vandergast et al. 2008; Wood et al. 2013).

Fino ad oggi tutti gli studi basati sull'utilizzo dei principi di Landscape Genetics hanno avuto come obiettivo quello di utilizzare i dati relativi alla diversità genetica correlata alla distanza geografica, per concentrarsi specialmente su processi contemporanei, chiaramente distinti dallo studio dei processi storici (Wang, 2010). Questi studi sono stati quindi maggiormente dedicati ad identificare eventi di divergenza genetica, barriere geografiche o deriva genetica in vista di una conservazione futura più appropriata (Storfer et al. 2010; Parisod et al. 2012; Manel et al. 2013).

Allo stesso tempo è utile ricordare come studi sulla divergenza e/o diversità genetica siano ormai da decenni affrontati attraverso indagini filogeografiche. La filogeografia si occupa dello studio della distribuzione geografica delle linee genetiche che sono presenti nelle popolazioni all'interno di una specie o in gruppi di specie filogeneticamente vicine e contribuisce ad una miglior definizione della biodiversità consentendo di ricostruire la storia evolutiva delle popolazioni che si sono differenziate nel corso del tempo, consentendo anche indagini comparate tra diverse specie allo stesso tempo.

La genetica del paesaggio e la filogeografia sono entrambe interessate, quindi, alla comprensione della distribuzione della variazione genetica all'interno di ambienti naturali. Ci sarà ovviamente una certa sovrapposizione tra gli obiettivi ed i metodi dei due campi. Tuttavia, esistono alcune

importanti distinzioni, che sono alle volte trascurate. La più importante è che la filogeografia indaga i processi storico-evolutivi che generano i modelli di variazione genetica, mentre la genetica del paesaggio indaga le strutture spaziali che la influenzano. Quindi, anche se distinte tra di loro, le due discipline non sono in alcun modo incompatibili (Chan et al. 2011; Vandergast et al. 2011). Anzi, le loro differenze le rendono ideali per indagare tutti quei processi che hanno generato gli attuali modelli di variazione genetica e diversificazione in natura e possono costituire eccellenti complementi per la comprensione sia della storia di un territorio che dei processi micro- o macroevolutivi delle specie.

1.9 Studi pregressi I: il genere *Quercus*

Le querce sono ormai da anni al centro di numerosi studi per comprenderne i processi evolutivi, la speciazione e la diversificazione. Esse sono state studiate sulla base della filogenesi delle specie, delle relazioni intra-generiche (Denk and Grimm 2010, Hipp et al. 2014, Eaton et al. 2015), della diversità genetica e biogeografica delle specie (e.g. Magri et al. 2007, Bagnoli et al. 2015, Cavender-Bares et al. 2015), delle dinamiche storiche che hanno portato alla loro distribuzione (Vessella et al., 2015) e degli adattamenti ecologici che le caratterizzano nei diversi ambienti (e.g. Modesto et al., 2014). Segue un breve *excursus* sugli studi più recenti ed informativi condotti in America ed Europa.

Come già riportato in precedenza, Denk e Grimm nel 2010, per primi, hanno esaminato le relazioni filogenetiche tra le specie di querce dell'Eurasia occidentale compresa la parte occidentale della catena himalayana. Basandosi sui dati dei marcatori nucleari ITS e 5S-IGS, hanno identificato tre grandi gruppi infragenerici: *Cerris*, *Ilex* e *Quercus*. Hipp e Eaton nel 2014 hanno utilizzato la tecnica della *NGS* (*Next Generation Sequencing*) su di un sito di restrizione (RAD-seq) per cercare di risolvere il quadro filogenetico di un gruppo di querce americane (*Quercus serie virentes*), e nel 2015 hanno utilizzato i dati genomici della RAD-seq per schematizzare un quadro tassonomico complessivo su tutte le principali specie di querce americane.

Più in dettaglio a livello geografico, Magri et al. nel 2007 hanno studiato il DNA cloroplastico di 110 popolazioni di *Quercus suber* al fine di identificare le possibili relazioni tra la distribuzione geografica della variabilità genetica e la storia paleogeografica del Mediterraneo occidentale. Sono stati identificati cinque diversi aplotipi la cui distribuzione ha effettivamente una struttura chiaramente geografica. I risultati dimostrano che le diverse discendenze della specie hanno subito una deriva genetica geograficamente coerente con gli eventi orogenetici dell'Oligocene e Miocene.

Puntare a colmare le lacune nella comprensione del ruolo dei rifugi glaciali nel Mediterraneo orientale e la loro connessione con altri rifugi in tutta Europa, è stato invece lo scopo principale di Bagnoli et al. nel 2015, studiando la distribuzione della diversità genetica e la struttura genetica di popolazioni di *Quercus cerris* in relazione alla storia demografica nel Quaternario e ad altri eventi più antichi. Lo studio, condotto per mezzo della variabilità riscontrata con la tecnica dei microsatelliti, ha evidenziato il ruolo chiave di differenziazione e rifugio svolto dalla penisola anatolica.

Nello stesso anno, Cavender-Bares et al., hanno generato una filogenesi fossile di *Quercus virentes* utilizzando i dati ottenuti con Rad-seq per stimare i tempi di divergenza, microsatelliti nucleari, sequenze plastidiali e una regione dell'introne della nitrato riduttasi (NIA-i3) per esaminare la diversità genetica all'interno di ogni specie, il flusso genico tra le specie e la dimensione della popolazione ancestrale.

Vessella et al. nel 2015 hanno invece testato l'approccio ENM (Modellizzazione della Nicchia Ecologica) per ricostruire la dinamica del passato della *Quercus suber*, specie chiave del bioma Mediterraneo, ed ottenere così informazioni su futuri rischi per la specie e la loro conservazione, mentre Modesto et al. nel 2014, hanno cercato di ottenere informazioni sulla *Quercus suber* ed il suo adattamento alle diverse condizioni ambientali aggravate dai cambiamenti climatici degli ultimi anni. Per capire come quest'ultima possa far fronte alle nuove minacce, 40 popolamenti lungo tutto l'areale della specie sono stati analizzati attraverso l'utilizzo di sei geni candidati significativi per l'adattamento ambientale. Purtroppo, i risultati ottenuti non sono stati in grado di rivelare importanti processi adattativi in corso.

Altri pattern, per lo più basati sulla variazione neutra, sono invece risultati importanti per conoscere le aree con un maggiore o minore ricchezza genetica e diversità, al fine di una migliore strategia di conservazione, rivelando anche una prospettiva diversa sugli eventi di colonizzazione post-glaciazione a grandi scale geografiche e tassonomiche.

Ad esempio, nell'area del Mediterraneo, ulteriori studi hanno per lo più evidenziato una distribuzione delle relative strutture genetiche di numerose specie fortemente influenzate dalle glaciazioni del Quaternario. Nell'Europa continentale sono stati identificati pattern latitudinali di diversità genetica delle specie, risultanti dalle ricolonizzazioni post-glaciali dell'Olocene a partire proprio da quei rifugi glaciali localizzati nella parte meridionale del Mediterraneo (e.g. Brewer et al. 2002, Petit et al. 2003, Liepelt et al. 2009). Conord et al. nel 2012, hanno studiato la genetica di popolazione di diversi gruppi di specie animali e vegetali a distribuzione Mediterranee, da quelle endemiche a quelle maggiormente diffuse, utilizzando approcci in gran parte filogeografici per conoscerne i processi evolutivi, di dispersione e differenziazione genetica inter ed intra-specie. E'

stato trovato come risultato maggiormente frequente un tipo di pattern di diversità genetica longitudinale, generalmente caratterizzato da un aumento del gradiente da ovest verso est, attribuibile probabilmente a processi di ricolonizzazione dopo l'ultima grande glaciazione (LGM). Tuttavia, l'area del Mediterraneo è stata meno colpita dalle ultime glaciazioni (Médail and Diadema 2009), e diverse prove hanno evidenziato come la struttura genetica di alcune specie legnose, molto antiche e fortemente coevolutesi con il Mediterraneo, potrebbero essere risultate anche da processi più antichi, quali la frammentazione di areali originali dovuta ai processi paleologici del Mediterraneo durante il Cenozoico (Chen et al., 2014), processi di vicarianza climatica e/o geografica durante il Miocene (Magri et al. 2007, Désamoredé et al. 2011, Migliore et al. 2012) e da fattori biologici aggiuntivi come fenomeni di ibridazione su vasta scala (Papageorgiu et al. 2008). Ciò dimostra come la struttura genetica di molte specie nel Mediterraneo sia ancora lontano da essere compresa appieno, e come il ruolo chiave svolto da molte regioni del bacino debba ancora essere indagato. Tra queste ultime, in particolare, le regioni paleobiogeografiche nella zona orientale e meridionale del Mediterraneo sono ancora troppo scarsamente studiate (Nieto Feliner 2014).

1.10 Studi pregressi II: le querce del gruppo *Ilex*

Petit et al. nel 2005, hanno analizzato campioni di 174 popolazioni che coprono gran parte dell'areale di *Q. ilex* (ma non estesi più ad est di Creta) (Fig.17), rilevando l'esistenza di cinque grandi cluster genetici corrispondenti all'area dei Balcani, la penisola Italiana, il nord Africa, la penisola Iberica orientale e le coste atlantiche europee. Il modello di differenziazione genetica proposto è quello di una graduale espansione del *range*, a partire dal Miocene, da sud-est (Mar Egeo) verso sud-ovest (Marocco), passando per la porzione meridionale della penisola italiana. Da questa, una seconda direttrice di colonizzazione sarebbe stata diretta verso nord-ovest (Francia) fino alle coste atlantiche. La penisola italiana, il nord-Africa ed il sud della penisola iberica avrebbero agito da rifugi glaciali.

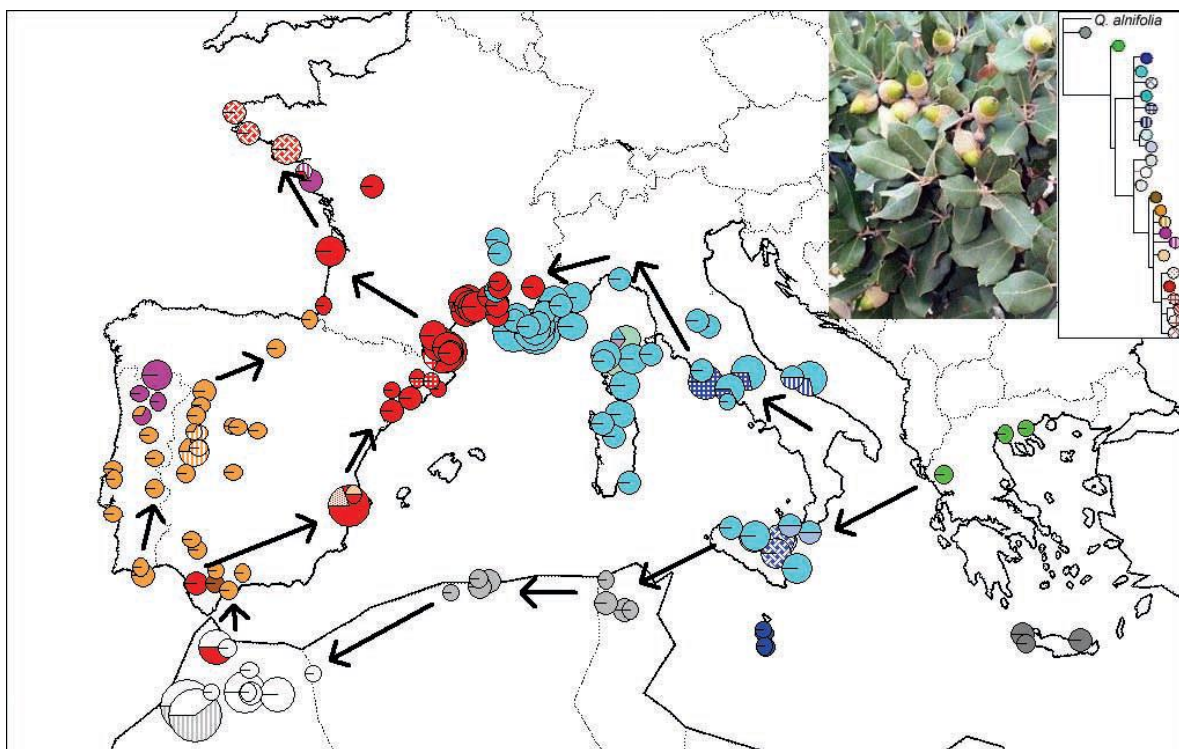


Fig. 17 – Filogeografia di *Q. ilex* secondo Lumaret et al. (2002) e Petit et al. (2005). La mappa indica la distribuzione geografica degli aplotipi rilevati

Viceversa, attraverso studi precedenti su *Quercus coccifera*, basati sull'utilizzo di marcatori nucleari, come gli AFLPs, l'ITS e gli allozimi, Lòpez de Heredia et al. (2007) e Toumi and Lumaret (2010) hanno evidenziato l'esistenza di pattern genetici molto omogenei ed una consistente

manca di struttura filogeografica, soprattutto nella zona centro-occidentale del bacino del Mediterraneo.

D'altra parte, sempre Lòpez de Heredia et al. (2007), hanno dimostrato, attraverso un'analisi comparativa sul DNA plastidiale di 121 popolazioni di *Quercus ilex* e 50 popolazioni di *Quercus coccifera*, con la tecnica della PCR-RFLPs (Jiménez & al., 2004), l'esistenza di due lignaggi dove le due specie sono completamente mescolate (Fig.18): *ilex-coccifera* II (i-cII) e *ilex-coccifera* II (i-cIII). In particolare, in questo studio è stata analizzata anche la quercia da sughero (*Q. suber*; 121 popolamenti), ed un terzo lignaggio (i-cI) è risultato comprendere aplotipi di tutte e tre le specie analizzate, fornendo una prima indicazione della complessità della storia evolutiva delle querce appartenenti ai gruppi Ilex e Cerris, e delle frequenti interrelazioni avvenute storicamente tra membri di questi gruppi, mediante ibridazione e introgressione.

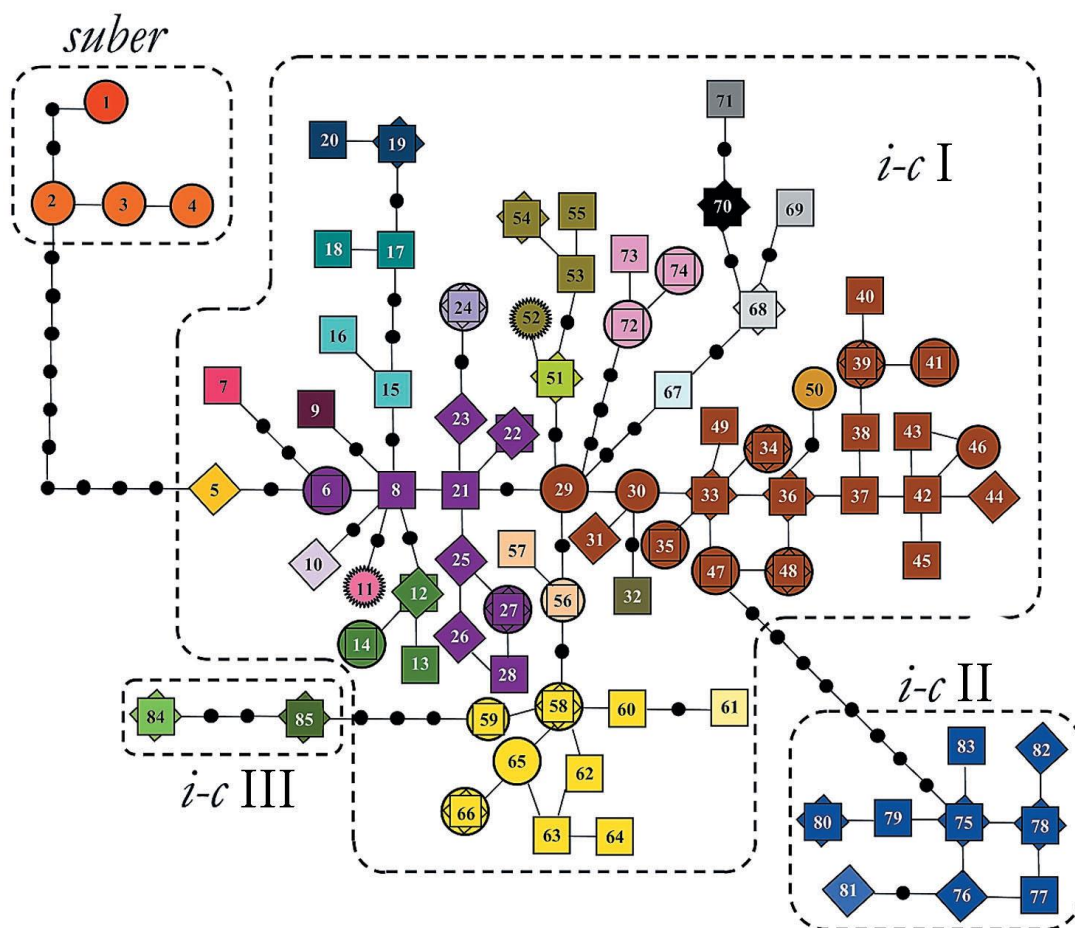


Fig. 18 – Network dei clorotipi e lignaggi di cpDNA. I simboli indicano le seguenti appartenenze: “○” clorotipo presente in *Quercus suber*; “□” clorotipo presente in *Quercus ilex*; “◇” clorotipo presente in *Quercus coccifera*; “⊙” clorotipo presente negli ibridi *Quercus suber* x *Quercus ilex* (Lopez de Heredia et al. 2007)

In effetti, in un lavoro recente che punta a chiarire l'origine delle specie del gruppo Ilex, Simeone et al. (2016) hanno approfondito lo studio della variabilità del DNA plastidiale nel genere *Quercus*, mediante le analisi di sequenza di tre marcatori su 141 campioni di querce appartenenti ai 6 gruppi intergenerici (secondo Denk e Grimm 2010) (Fig.19), tra i quali 81 campioni rappresentanti 20 specie euroasiatiche del gruppo Ilex, ed hanno rilevato una divergenza genetica estremamente elevata. In particolare, gli aplotipi trovati nei 59 campioni del gruppo Ilex analizzati sulle quattro specie esclusive del Mediterraneo (*Quercus ilex*, *Quercus coccifera*, *Quercus aucheri*, *Quercus alnifolia*), formavano tre lignaggi ben distinti, definiti “Euro-Med” (Euro-mediterraneo), “Cerris-Ilex” (principalmente localizzato nell’Egeo) e “WAHEA” (Asia occidentale-Himalaya-Asia orientale). A conferma della mescolanza di specie che caratterizza le querce in maniera estremamente ampia, una discendenza (Euro-Med) è caratterizzata dalla presenza contemporanea di *Quercus coccifera* e *Quercus ilex*, gli aplotipi invece dei lignaggi “Cerris-Ilex” e “WAHEA” sono caratterizzati dalla presenza delle specie del gruppo Ilex mediterranee e di membri del gruppo Cerris e dei gruppi Ilex e Cyclobalanopsis (rispettivamente dell’Asia centrale ed orientale).

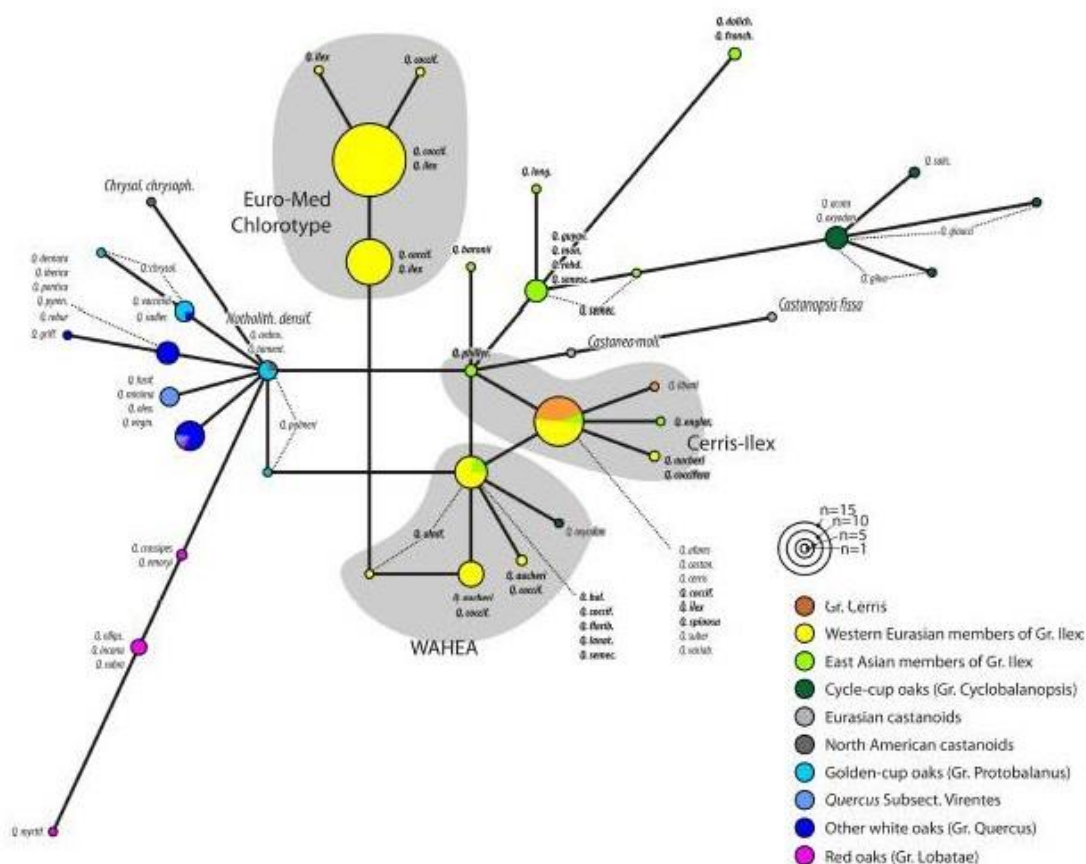


Fig. 19 – Rete di aplotipi basati sullo spaziatore TrnH-psbA. La colorazione si riferisce all'appartenenza tassonomica dei campioni (Simeone et al. 2016)

Le divergenze di questi lignaggi, ben localizzati dal punto di vista geografico (Fig.20), molto probabilmente precedono la comparsa dei *taxa* moderni ed il complesso quadro d'insieme che ne emerge sembra essere il risultato della probabile interazione di diversi fenomeni evolutivi, quali la condivisione di tratti ancestrali, l'introgresione asimmetrica tra membri ancestrali del gruppo *Ilex* e degli altri due gruppi di querce (*Cyclobalanopsis* e *Cerris*), suddivisione incompleta dei caratteri nelle varie discendenze (*incomplete lineage sorting*), e ibridazione in tempi recenti.

Pertanto, tutti i dati attualmente a disposizione indicano chiaramente che i vari processi coinvolti nella formazione e diversificazione del gruppo *Ilex* sono molto complessi, strettamente legati al contesto geografico e ancora da valutare.

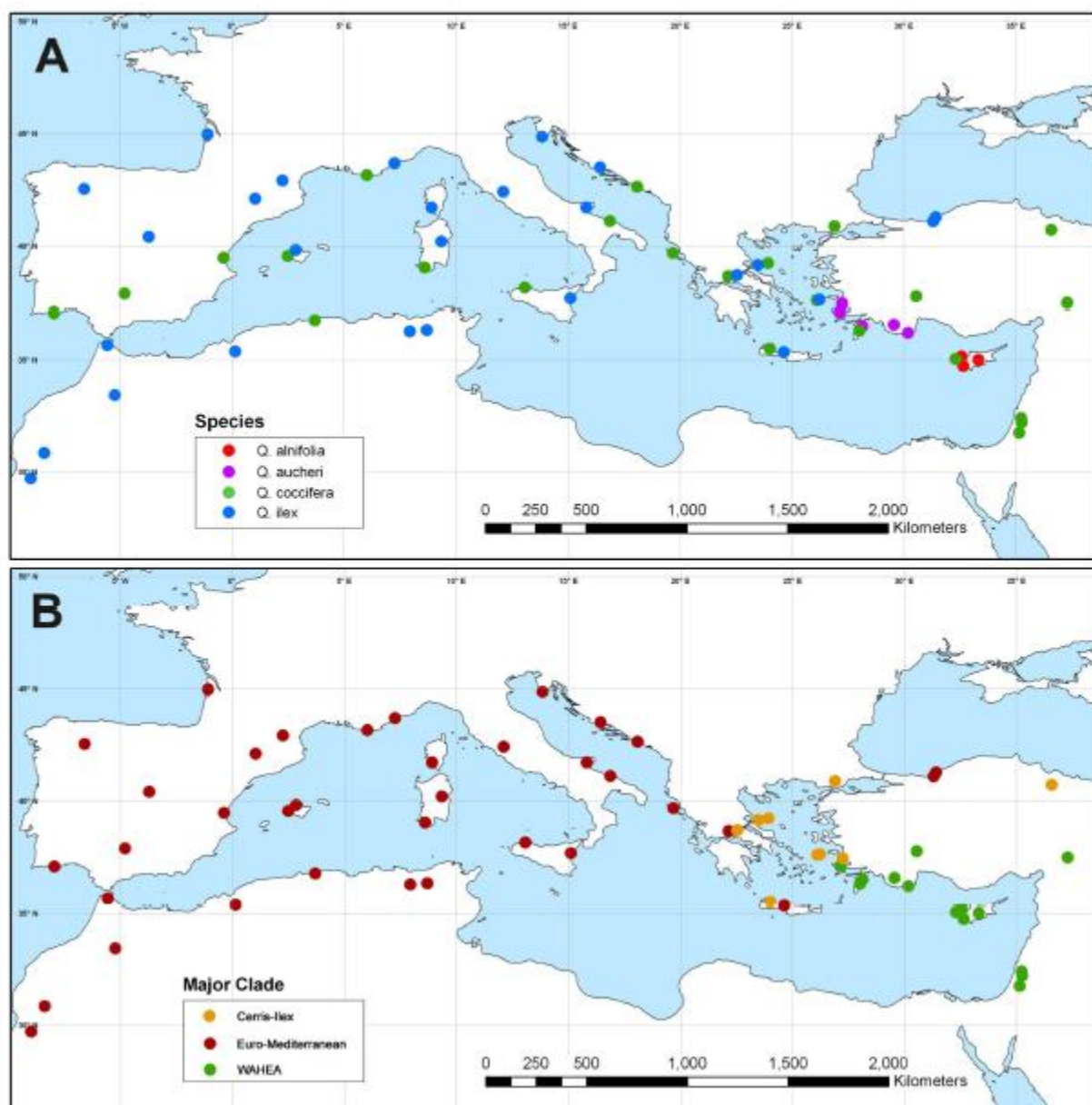


Fig. 20 – Pattern geografici della variazione di aplotipi plastidiali negli individui di *Quercus* del gruppo *Ilex*. La mappa (A) mostra l'identità tassonomica degli individui campionati. La mappa (B) mostra i gruppi aplotipici di cui fanno parte.

1.11 Scopo del lavoro

Svelare i processi evolutivi del passato che hanno modellato la distribuzione delle risorse genetiche forestali è importante per consentire una futura gestione e conservazione della biodiversità. Allo stesso tempo questi processi evolutivi possono offrire anche importanti informazioni di tipo storico ed ecologico sulle aree geografiche che hanno avuto ruoli chiave durante la formazione e diversificazione delle specie.

Infatti, la premessa di base alla conservazione delle foreste e delle loro risorse genetiche risiede nella conoscenza della storia macro- e micro-evolutiva delle singole specie e, possibilmente, delle varie popolazioni distribuite all'interno di un'area geografica. Tale conoscenza si può riassumere nel concetto di "struttura genetica delle specie" e rappresenta l'identificazione e interpretazione di eventi evolutivi avvenuti in queste, in relazione allo spazio geografico e al tempo.

Pertanto, lo scopo principale di questo lavoro è stato quello di approfondire le strutture genetiche di questo gruppo di specie nel Mediterraneo, incrementando il campionamento a carico delle quattro specie (*Q. ilex*, *Q. coccifera*, *Q. alnifolia*, *Q. aucheri*), includendo campioni da zone geografiche mai studiate precedentemente (Mediterraneo orientale e varie zone del Nord Africa), ed integrando i risultati molecolari ottenuti con i concetti e gli strumenti della Landscape Genetics a quelli della filogeografia. Gli obiettivi preposti sono: (i) dettagliare i pattern di diversità presenti nelle quattro specie lungo tutto il loro areale Mediterraneo; (ii) determinare la distribuzione precisa dei lignaggi identificati negli studi precedenti, valutando il ruolo giocato sulla loro diversificazione da parte delle diverse regioni e (iii) fornire nuovi dati utili ad una migliore comprensione dell'evoluzione dell'intero gruppo *Ilex* e della sua colonizzazione del Mediterraneo.

2. MATERIALI E METODI

Campionamento floristico

La strategia di campionamento è stata progettata in maniera tale da rappresentare significativamente l'intero areale di ogni singola specie in esame.

Il dataset finale è composto da un totale di 124 campioni, di cui 116 delle due specie più diffuse, ovvero *Quercus ilex* e *Quercus coccifera* (con 58 campioni ciascuna), e 8 campioni delle due specie endemiche *Quercus aucheri* e *Quercus alnifolia*. In accordo con una tassonomia ancora contrastante, *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (syn. *Q. rotundifolia* o *Q. ballota*) è stata considerata come parte della variazione adattativa della specie e, come tale, inclusa così nel dataset di *Q. ilex* senza distinzioni tassonomiche.

Le foglie sono state raccolte da individui georeferenziati e conservati in gel di silice.

I campioni sono riportati nelle Fig. 20-23 e Tab.2-4.

Provenienza	Specie	Sigla	Latitudine	Longitudine
Italy (Viterbo)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex1	42,420677	12,107669
Italy (Sardinia – Pula, CA)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex2	39,076523	8,851695
Croatia (Pula)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex3	44,866623	13,849579
Italy (Gargano)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex4	41,722405	15,829030
Marocco (Tangeri)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex5	35,665316	-5,551865
Spain (Ponferrada)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex6	42,549996	-6,598259
Italy (Rossano, CS)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex7	39,344070	16,383110
Spain (Mallorca)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex8	39,826150	2,847270
Italy (Sicily - Zafferana Etnea)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex9	37,689744	15,105272
France (Corsica - Olmeto)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex10	41,716815	8,917616
France (Nizza)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex11	43,696036	7,265592
France (Rennes-le-Chateaux)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex12	42,926739	2,264017
Algeria (Mascara)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex13	35,390412	0,149499
Algeria (Souk Ahras)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex14	36,283760	7,955379
Greece (Crete - Skouloufia)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex15	35,352794	24,638726
Greece (Drymaia)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex16	38,708294	22,559058
Croatia (Kastela)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex17	43,508132	16,440194
Greece (Ikaria)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex18	37,624897	26,239067
Turkey (Kocaman)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex19	41,104886	31,308174
Turkey (Eregli)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex20	41,289444	31,418056
Tunisia (Nebeur)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex21	36,335244	8,704075
Marocco (Azrou)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex22	33,441448	-5,224798

Marocco (Tizi n'test)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex23	30,864722	-8,378056
Marocco (Taфраout)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex24	29,724338	-8,971462
Greece (Skiathos)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex25	39,162663	23,490976
France (Lacanau)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex26	44,978459	-1,075745
Spain (Coll de Corniols)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex27	42,118520	1,046534
Spain (Madrid)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex28	40,416775	-3,703790
Spain (Saragozza)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex29	41,955202	-2,653095
France (Nimes)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex30	43,882057	4,324951
France (Corsica - Capo Corso)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex31	43,000598	9,383262
Italy (Lago di Garda)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex32	45,882480	10,837128
Turkey (Anadolu)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex33	40,827320	29,448638
Malta (La Valletta)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex34	35,904625	14,372070
Greece (Mt. Ossa)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex35	39,475914	22,4136
Greece (Vasilika)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex36	38,971041	23,338695
Spain (Andalusia- Sierra de Grazalema)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex37	36,993778	-5,374146
Spain (Montseny)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex38	41,4832	2,225799
Italy (Ozzano dell'Emilia) (BO)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex39	44,263363	11,263102
Spain (Navalvillar de Pena)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex40	39,144973	-6,088257
Italy (Sardinia-Supramonte)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex41	40,204411	9,357752
Italy (Sicily- Erice)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex42	38,2196	12,35792
Italy (Sicily - Pantelleria)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex43	36,465477	12,01704
Greece (Thessaloniki)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex44	40,381802	22,564601
Croatia (Korčula)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex45	42,950517	17,108259
Italy (Naples- Vesuvio)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex46	40,821864	14,429455
Greece (Githion)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex47	36,774876	22,558826
Italy (Collesalveti, PI)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex48	43,592328	10,474663
Italy (S. Maria di Leuca, LE)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex49	39,481408	18,213834
Albania (Tomorri)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex50	40,690531	20,140572
Algeria (Azazga)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex51	36,749888	4,388337
Spain (El Colmenar)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex52	36,84556	-3,749313
Greece (Crete - Krasi)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex53	35,242744	25,501888
Turkey (Gazionmanspasa)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex54	41,076411	28,859089
Turkey (Beykoz)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex55	41,062646	29,184072
Italy (Sardinia - Alghero)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex56	40,604956	8,161781
Turkey (Imroz- Gokceada)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex57	40,20556	25,871563
Italy (Conero)	<i>Q. ilex</i>	Q. ilex58	43,545204	13,590454

Tab.2 – Elenco campioni *Quercus ilex*

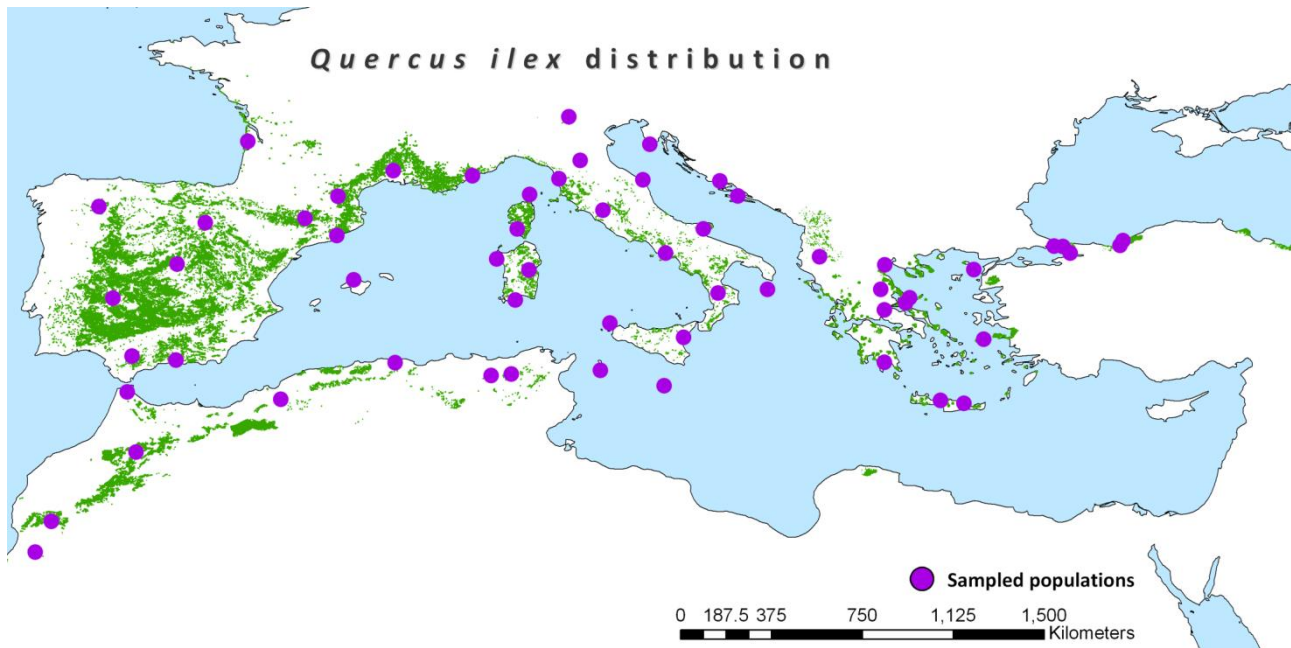


Fig. 21 – Area di distribuzione e localizzazione dei campioni di *Quercus ilex*

Provenienza	Specie	Sigla	Latitudine	Longitudine
Italy (Bari)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc1	41,117143	16,871871
Italy (Sardinia - Masainas)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc2	39,038843	8,610570
Croatia (Dubrovnik)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc3	42,650665	18,094423
Turkey (Isparta)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc4	37,764771	30,556561
Portugal (Faro)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc5	37,081476	-7,940826
Israel (Ein Karem)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc6	31,764240	35,149502
Cyprus (Akamas)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc7	35,050000	32,300000
Italy (Sicily - Capo Rama)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc8	38,168034	13,081856
Greece (Vardousia)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc9	38,666667	22,166667
Greece (Rhodos)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc10	36,305617	28,021391
Spain (Mallorca)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc11	39,565348	2,503368
France (Provence)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc12	43,169492	6,027209
Greece (Corfù)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc13	39,689508	19,687884
Greece (Crete- La Chania)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc14	35,512410	24,024289
Spain (Cordoba)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc15	37,900323	-4,779854
Greece (Ikaria)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc16	37,596723	26,112308
Turkey (Malkara)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc17	40,895168	26,909430
Turkey (Pazarcik)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc18	37,483333	37,300000
Palestine (Nablus)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc19	32,225040	35,260971
Turkey (Erbaa)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc20	40,722283	36,583557

Spain (Valencia)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc21	39,472245	-0,375137
Greece (Alonyssos)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc22	39,245401	23,941751
Algeria (Boumerdes)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc23	36,767596	3,702900
Israel (Mt. Tabor)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc24	32,411361	35,232538
Marocco (Tangeri)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc25	35,796110	-5,744968
Tunisia (Tabarka)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc26	36,960729	8,751099
Bulgaria (Mikrevo)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc27	41,623591	23,196252
Greece (Cefalonia)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc28	38,200418	20,564818
Spain (Huesca)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc29	41,8941	-0,162506
Spain (Tanés)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc30	43,313188	-5,4006960
Cyprus (Kandara)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc31	35,445000	33,203000
Greece (Rentina)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc32	40,393224	23,365273
Portugal (Obidos)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc33	39,421342	-9,154816
Greece (Vasilika)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc34	38,991858	23,368221
Greece (Mt. Kourendon)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc35	39,376000	20,376000
Spain (Jaca)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc36	42,920229	-1,222687
Greece (Tornos)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc37	38,441938	21,402826
Jordan (Ajloun)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc38	32,194962	35,445224
Italy (Sicily - Mazara del vallo)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc39	37,681647	12,63485
Greece (Agistri)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc40	37,421245	23,211410
Albania (Argirokastro)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc41	40,061257	20,112762
Jordan (Petra)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc42	30,193228	35,263128
Libya (Al Bayda)1	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc43	32,72913	21,585832
Spain (El Colmenar)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc44	36,39144	-5,47142
Spain (Miranda de Ebro)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc45	42,687546	-2,950187
Marocco (Cap Spartel)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc46	35,792197	-5,911446
Lebanon (Beit Younes - Baalbek)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc47	34,004182	36,215780
Lebanon (Beichoueit - Akkar)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc48	34,551811	36,136551
Lebanon (Habbariyeh - Hasbaya)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc49	33,416828	35,668774
Turkey (Germiyan)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc50	38,316878	26,463375
Turkey (Sardes)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc51	38,477692	28,050394
Turkey (Kemerburgaz)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc52	41,142426	28,923935
Turkey (Manavgat)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc53	36,768460	31,435581
Turkey (Gokceada)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc54	40,104166	25,836225
Italy (Sicily - Caltagirone)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc55	37,132232	14,530204
Montenegro (Cetinje)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc56	42,372796	18,931449
Greece (Crete- Mithi)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc57	35,038910	25,574076
Libya (Al Bayda_2)	<i>Q. coccifera</i>	Qcoc58	32,81283	22,085637

Tab. 3 – Elenco campioni *Quercus coccifera*

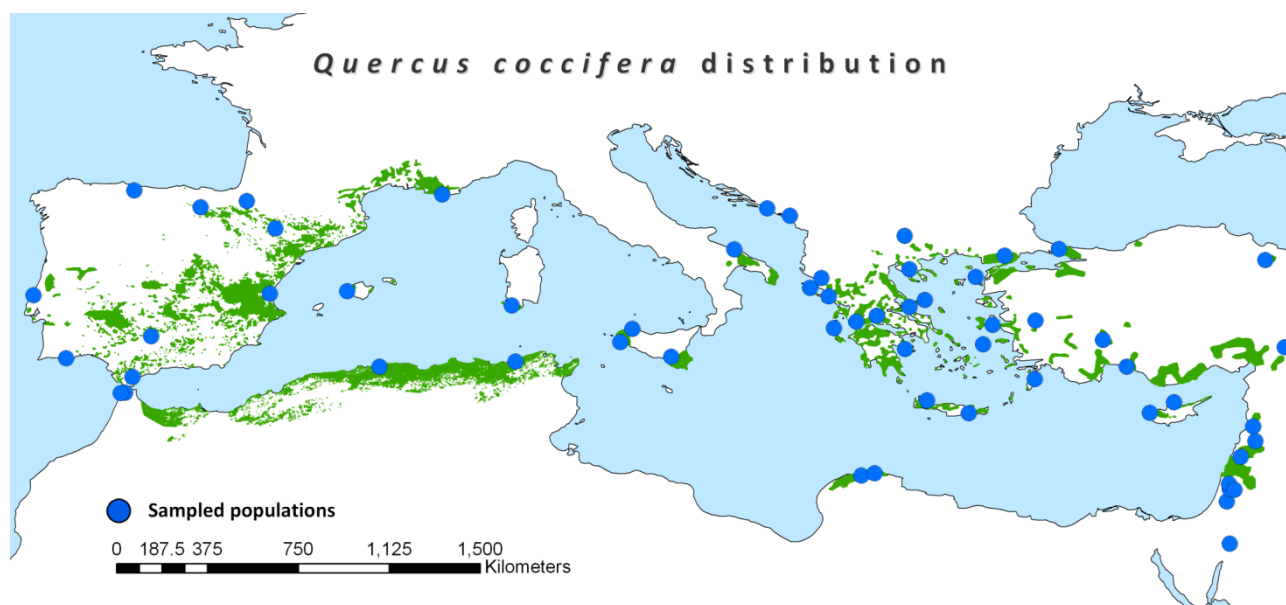


Fig. 22 – Area di distribuzione e localizzazione dei campioni di *Quercus coccifera*

a)

Provenienza	Specie	Sigla	Latitudine	Longitudine
Turkey (Marmaris)	<i>Q. aucheri</i>	Q. au1	36,504692	28,143976
Turkey (Kumluca)	<i>Q. aucheri</i>	Q. au2	36,212465	30,182
Turkey (Kozagaci)	<i>Q. aucheri</i>	Q. au3	36,57735	29,552053
Turkey (Turgutreis)	<i>Q. aucheri</i>	Q. au4	37,11288	27,153732
Turkey (Soke)	<i>Q. aucheri</i>	Q. au5	37,463094	27,24741

b)

Provenienza	Specie	Sigla	Latitudine	Longitudine
Cyprus (n.d)	<i>Q. alnifolia</i>	Q. aln1	35,156407	32,564735
Cyprus (Kionia)	<i>Q. alnifolia</i>	Q. aln2	35,004128	33,333664
Cyprus (Kykkos)	<i>Q. alnifolia</i>	Q. aln3	34,747255	32,658119

Tab. 4 – Elenco campioni *Quercus aucheri* a) e *alnifolia* b)

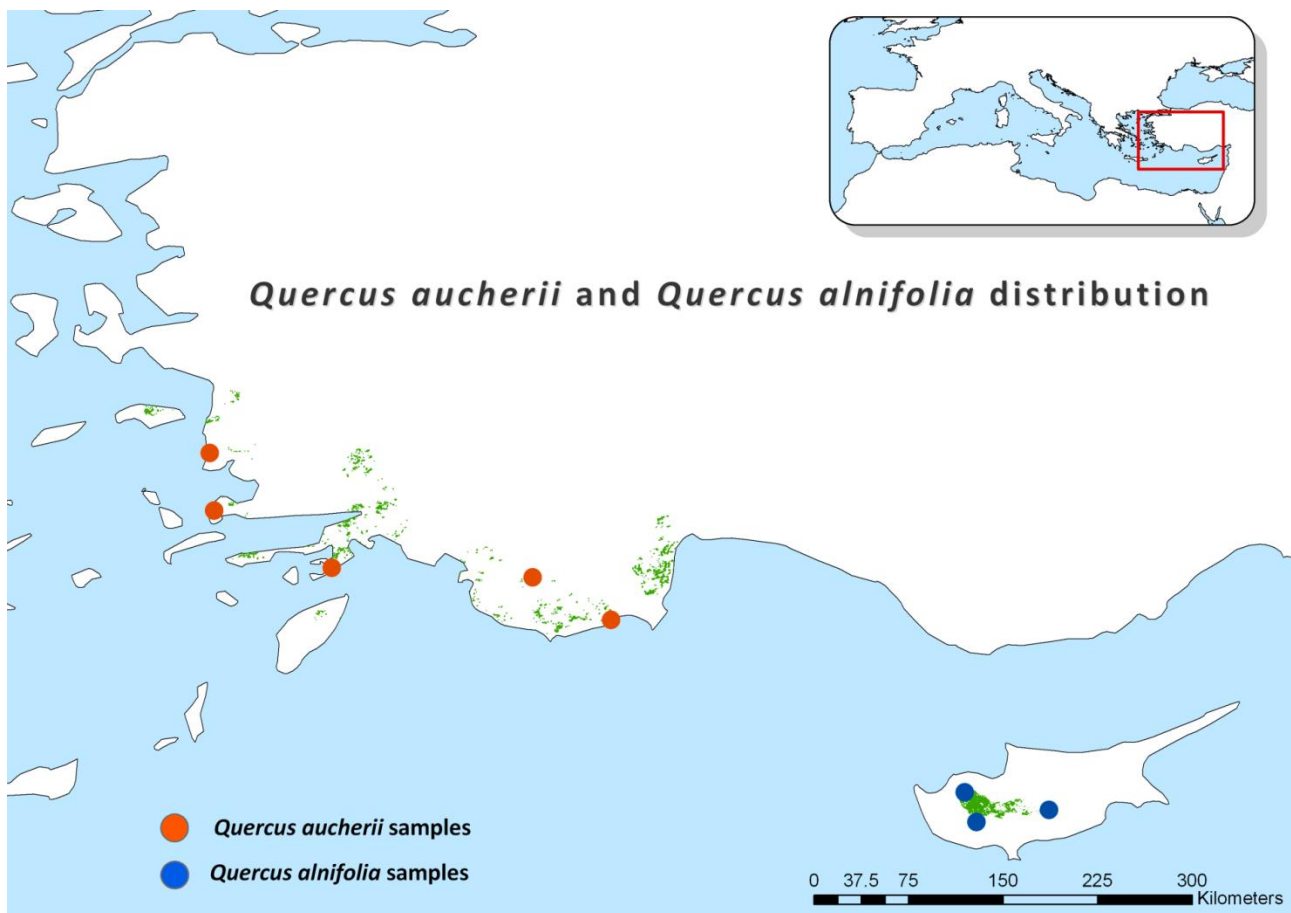


Fig. 23 – Area di distribuzione e localizzazione dei campioni di *Quercus aucheri* e *Quercus alnifolia*

2.1 Protocollo molecolare

Per quanto riguarda le analisi genetiche delle specie prese in esame, eseguite in laboratorio, i procedimenti principali sono stati quelli di preparare i campioni freschi attraverso la liofilizzazione dei tessuti fogliari, ovvero un processo che permette la conservazione nel tempo del campione attraverso la disidratazione dei tessuti, per procedere poi con l'estrazione del DNA tramite utilizzo di un kit commerciale e relativo protocollo, l'amplificazione del frammento estratto attraverso la PCR, la purificazione del frammento analizzato ed infine la determinazione della sequenza nucleotidica.

Estrazione del DNA

È stato utilizzato un kit commerciale specificamente preposto per l'estrazione del DNA (*DNAeasy Plant Minikit, Quiagen*), facile e rapido nell'esecuzione dei passaggi, con la possibilità di procedere con più campioni contemporaneamente. La sua peculiarità risiede nella scarsa pericolosità data la mancanza di sostanze tossiche (fenolo e cloroformio) utilizzate nelle altre metodologie di estrazione.

Il kit comporta l'uso di vari tamponi e di due diverse colonnine "*Microspin*" dotate di filtri per la purificazione dell'acido nucleico. Si procede con l'aggiunta del tampone di lisi al materiale precedentemente omogenato nel mortaio, per favorire la rottura delle cellule e la fuoriuscita del materiale citoplasmatico e nucleare, e l'aggiunta dell'enzima RNasi per degradare l'RNA. La soluzione viene incubata per 60 minuti a 60°/65°. La reazione di lisi viene poi bloccata con un tampone ed uno shock termico che permette la precipitazione delle proteine e dei polisaccaridi. La purificazione dell'estratto viene eseguita con vari passaggi su colonnine che filtrano i residui cellulari, ed infine, il DNA viene raccolto in una micro-provetta e conservato a -20°C.

Amplificazione dei frammenti marcatori

È stata condotta mediante la tecnica della "PCR" (*Polymerase Chain Reaction*) che prevede l'utilizzo di un *thermal cycler* (termocicizzatore) Gene Amp PCR System 2400 della Perkin Elmer. La procedura prevede che aliquote definite di DNA reagiscano con un preparato commerciale liofilizzato contenente tutti gli elementi necessari alla reazione di amplificazione (enzima TAQ polimerasi, tampone di reazione, nucleotidi A, C, G, T), a cui vengono aggiunti specifici segmenti

di DNA composti da oligonucleotidi, necessari all'innesco dell'amplificazione, denominati *Primers* (Fig.24). All'interno del termocicizzatore, la miscela viene sottoposta ad una serie di reazioni a catena tramite vari step che prevedono la separazione della doppia elica di DNA, l'appaiamento dei primers alle regioni omologhe e la produzione di nuove copie dei filamenti nucleari. La ripetizione di questo ciclo permette l'amplificazione in modo esponenziale della sola regione che interessa.

Locus	Primer Name	Sequence
trnH-psbA	trnH-psbA_fw trnH-psbA_rev	5'-CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3' 3'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-5'
rbcL	rbcL_fw rbcL_rev	5'-ATGTCACCACAAACAGAAAC -3' 3'-AGCGTAGATGGACGTCATCG -5'
matK	matK_fw matK_rev	5'-GTACTTGATGCGGGAAATGC -3' 3'-CAATGATTGCAAATCCTTCTGA -5'

Fig. 24 – Coppie di primers utilizzati per l'amplificazione dei tre frammenti marcatori

Purificazione del DNA amplificato

I prodotti delle PCR sono stati purificati seguendo il protocollo del manuale di utilizzo del kit commerciale GFX PCR DNA and *Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Il campione (25µl) applicato nella colonna *microspin*, fa sì che il DNA, dopo successive centrifugazioni, si leghi alle membrane. Un seguente lavaggio rimuove i sali e le altre contaminazioni dalle membrane legate al DNA. Quest'ultimo così purificato, viene eluito con un tampone e lasciato incubare a temperatura ambiente per un paio di minuti. Dopo aver eseguito un'ultima centrifugazione, il DNA sarà conservato a -20°C.

Sequenziamento

Le sequenze purificate sono state sottoposte a reazioni di sequenziamento presso i laboratori della *Humanizing Genomics MacroGen* (<http://www.macrogen.com>). La sequenza nucleotidica di ciascun frammento è stata determinata su entrambe le eliche utilizzando in ciascuna reazione il corrispettivo primer in posizione 5'.

2.2 Marcatori molecolari utilizzati

RbcL

In biologia molecolare, il gene è uno dei più utilizzati e studiati data la sua universalità e facilità nell'amplificazione ed allineamento (Newmaster *et al.* 2006). Questo codifica per le diverse subunità dell'1-5 ribulosio difosfato carbossilasi-ossigenasi, che è l'enzima responsabile della carbossilazione del ribulosio-1,5-bifosfato con formazione di due molecole di acido 3-fosfoglicerico nella prima fase del ciclo di Calvin.

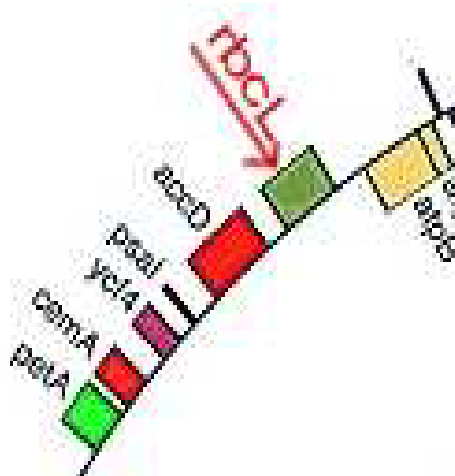


Fig. 25 - posizionamento del gene RbcL all'interno del genoma

La proteina ha un peso molecolare di 560 kDa ed è composta da 8 subunità maggiori che ne costituiscono la parte centrale e da 8 subunità minori organizzate in 2 tetrameri posti alla base e alla sommità della molecola. Ogni molecola di *RuBisCO* possiede otto siti attivi (dato che ogni subunità

maggiore ne ha uno). È considerato essere l'enzima più diffuso sulla terra ed anche uno dei principali fissatori del carbonio (Kapralov et al. 2007).

Data la sua natura altamente conservativa e considerata la facilità di amplificazione ed analisi, questo frammento è considerato un caposaldo negli studi filogenetici soprattutto a livello di specie, genere o famiglia (Kress et al. 2007) anche se ha scarsi livelli di discriminazione a livello intraspecifico. Il frammento usato è lungo 743 bp e si dispone all'inizio del gene come mostrato in Figura 25.

MatK

Nell'ambito del progetto DNA *barcoding*, *MatK* è considerato il frammento ufficiale per la discriminazione delle diverse specie vegetali (Fig. 26). Questo frammento è lungo circa 1600 bp nella maggior parte delle angiosperme ed è coinvolto per il II gruppo dell'introne di *trnK* che codifica per la tRNA *Lys* (UUU) (Neuhaus & Link 1987).

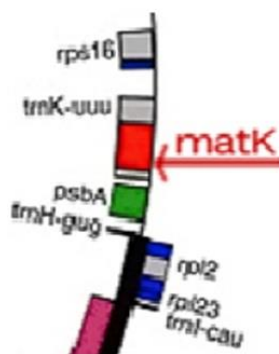


Fig. 26 - posizionamento del gene MatK all'interno del genoma

Questi sono una classe d'introni rinvenuti in rRNA, mRNA e tRNA di piante, funghi e batteri. La maturasi è una proteina indispensabile nel processo di *splicing* del RNA delle cellule viventi mentre *in vitro* non è necessaria. Appartenendo ad una regione codificante spesso è stato usato per

ricostruzioni filogenetiche a livello di ordine e famiglia, ma anche a livello di specie e genere (Wolfe 1991; Hilu et al. 2003; Muller et al. 2006; Chase et al. 2007; Lahaye et al. 2008), soprattutto per l'elevato numero di sostituzioni, mutazioni non sinonime ed eventi di *indels* (inserzioni/delezioni) (Hilu et al. 2003). Il marcatore preso in considerazione è localizzato all'interno dell'introne come mostrato in Figura 26, tra la posizione 303 e 1823 (è lungo 696 bp).

TrnH-psbA

Questa regione è senza dubbio una delle più variabili dell'intero genoma cloroplastico delle Angiosperme (Shaw et al. 2007) e si pone a valle di *MatK* (Fig. 27). Comprende, nella sua struttura, due diverse porzioni con tassi evolutivi differenti: una evolutivamente conservata, ossia la regione 3'UTR - *psbA* (cioè una sequenza non tradotta, ma sottoposta a notevole pressione selettiva poiché fondamentale nella regolazione post trascrizionale del gene; è lunga circa 28-70 bp nelle Angiosperme, ed è seguita da una parte non trascritta variabile di lunghezza molto diversa da pianta a pianta da 200 fino a più di 1000 bp) ed una seconda maggiormente variabile, ovvero lo spaziatore intergenico non trascritto *TrnH-psbA*.

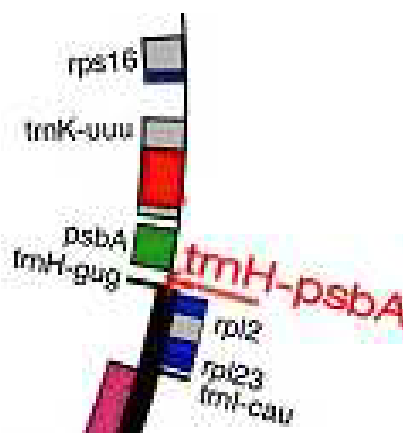


Fig. 27 -posizione dello spaziatore TrnH-psbA all'interno del genoma

I geni implicati sono un *tRNA* che trascrive per l'aminoacido Istidina, mentre l'altro è coinvolto nel funzionamento del fotosistema II della proteina D1, che è sita nella membrana dei tilacoidi. Questo è lungo 32 kDa e fa parte del complesso delle *binding protein* della clorofilla (D1). Questa regione inoltre è caratterizzata da un *loop* nella struttura secondaria del RNA, che ha il compito di segnale

di stop per la proteina codificata da *psbA*. Gli studi su questa regione sono iniziati con Aldrich (Aldrich et al. 1988) che mostrò come fosse caratterizzata da inserzioni e delezioni (*indels*) anche tra specie vicine. Studi successivi hanno mostrato il suo valore a livello sistematico (Sang et al. 1997) evidenziando anche la sua alta variabilità rispetto a *matK* o altri marcatori, tipo *trnL-trnF*. Purtroppo, questa può a sua volta rendere troppo difficili le analisi a livelli superiori al genere (per esempio Laurales: Renner 1999; Saxifragaceae: Soltis et al. 2001; Lecythidaceae: Hamilton et al. 2003). Tuttavia si riscontrano grandi facilità nell'amplificazione e nel sequenziamento. Il frammento è lungo circa 560 bp ed ha le regioni fiancheggianti sia su *trnH* che *psbA*.

Il genoma plastidiale di alcune specie (asiatiche) del genere *Quercus* è stato recentemente sequenziato ed un esempio è riportato in Fig.28.

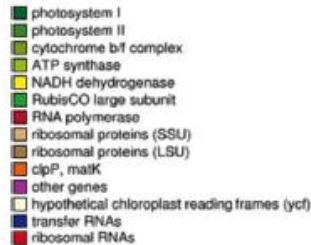


Fig. 28 - Genoma cloroplastico di *Quercus* (Du *et al.* 2015)

2.3 - *Analisi statistiche e filogeografiche*

I tracciati grezzi delle sequenze sono stati visualizzati sotto forma di elettroferogrammi con il software *CHROMAS* 2.3 (<http://www.technelysium.com.au>), in cui la successione dei diversi picchi rappresenta la sequenza nucleotidica reale del DNA esaminato. Sono state inoltre scaricate da GenBank le sequenze di alcuni individui asiatici di querce del gruppo *Ilex* (*Q. semecarpifolia*, *Q. baloot*, *Q. floribunda*) ed utilizzate come *outgroups* nelle successive analisi. *MEGA* 5.2 (Tamura *et al.* 2011) è stato usato per costruire multiallineamenti e calcolare le distanze genetiche intra/interspecifiche (utilizzando un algoritmo di “pairwise alignment” o allineamento per coppia di sequenze, necessario per confrontare più sequenze contemporaneamente). Le liste degli aplotipi, i principali parametri di diversità dei marcatori analizzati ed i test per valutare le dinamiche demografiche di popolazione, Tajima’s D e Fu’s Fs, sono stati calcolati con *DNASP* 5.1 (Librado and Rozas 2009); l’importanza statistica di questi test è stata valutata con simulazioni coalescenti di 1000 ripetizioni. Successivamente è stato prodotto un network filogenetico planare con l’algoritmo *Neighbor-Net* (NN), implementato nel programma *SplitsTree* 4.13.1 (Bryant and Moulton 2004, Huson and Bryant 2006). Il *Neighbor-Net* è considerato ottimale per illustrare al meglio le relazioni evolutive tra i campioni senza radice (unrooted), a partire da una matrice delle distanze. Questa è stata ottenuta utilizzando il modello “Kimura 2 parametri” (K2P) (Kimura 1980), il quale assume transizioni e trasversioni con probabilità differenti e frequenze uguali delle basi (Tamura *et al.* 2011). I dati riguardanti le sequenze dei campioni sono stati inoltre analizzati tramite il software *GenAlex* 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012) e quindi sottoposti a un’analisi di tipo *PCoA* (Principal Coordinate Analysis). Questo approccio permette di visualizzare modelli di correlazione tra due matrici di dati: la prima contenente l’informazione genetica sotto forma di matrice delle distanze, calcolata secondo un modello evolutivo (nel caso specifico attraverso il metodo K2P), e la seconda contenente le distanze geografiche tra i campioni studiati. Il programma *NETWORK* 4.6.1.1 (<http://www.fluxusengineering.com>) è stato utilizzato per sviluppare un network degli aplotipi mediante il metodo “Median Joining” (MJ). Per comprendere ulteriormente i modelli di differenziazione geografica e discutere presunti scenari di migrazione, sono stati prodotti anche dei network per ognuno dei principali lignaggi plastidiali riconosciuti, ovvero ‘Euro-Med’, ‘Cerris-Ilex’, ‘WAHEA’ (Simeone *et al.* 2016) con i marcatori separati. Infatti, mentre la diversità aplotipica in *rbcL* e nelle regioni parziali del gene *matK* e *trnK* è in gran parte limitata a poche sostituzioni di singoli nucleotidi, lo spaziatore intergenico *trnH-psbA* di norma differisce per molte sostituzioni e anche per variazioni di lunghezza. Questi pattern di mutazione potrebbero essere sovra- o sottorappresentate tramite analisi dirette utilizzando i software disponibili, quindi abbiamo

estratto i siti variabili da ogni sotto-allineamento utilizzando *MESQUITE* (Maddison and Maddison 2011) per una ricostruzione a mano di network completi usando le linee guida fornite da Bandelt et al. (2000).

2.4 - Analisi della struttura genetica spaziale

La correlazione tra le distanze geografiche e le distanze genetiche è stata esaminata tramite il test statistico di *Mantel* (Mantel 1967), realizzato con le distanze genetiche, linearizzate a coppie, dei tre marcatori utilizzati in maniera congiunta per ogni campione, ed il logaritmo naturale delle distanze geografiche (distanza espressa in km) dei diversi siti di campionamento di ogni specie (pacchetto *XLSTAT* implementato in Microsoft Excel). La *Genetic Landscapes GIS Toolbox* (Vandergast et al. 2011) integrata in *ArcMap 9.3.1*, è stata utilizzata per mappare dei paesaggi genetici virtuali utilizzando come input di partenza proprio le matrici delle distanze geografiche (in termini di latitudine e longitudine, ovvero le coordinate dei singoli campioni), quella delle distanze genetiche prodotte da *MEGA 5.2* ed una maschera, ossia un raster GRID, che definisca i confini spaziali delle analisi (ovvero l'area di studio). Abbiamo poi definito le dimensioni delle celle formanti la mappa genetica ed il raggio di ricerca (*radius setting*) che consente di definire quale tra i punti circostanti saranno utilizzati per spazializzare il dato di divergenza genetica di ogni popolamento. La mappa finale prodotta è stata generata utilizzando l'algoritmo di interpolazione spaziale IDW (*Inverse Distance Weight*), ed i valori di divergenza genetica sono stati settati tra 0 ed 1 in maniera tale che, anche le regioni con una divergenza genetica estremamente alta o bassa, indipendentemente dalla distanza, possano essere individuate e confrontate. Successivamente, la presenza di barriere genetiche, corrispondenti a zone geografiche con elevata differenziazione genetica tra i campioni di querce, è stata studiata utilizzando l'algoritmo di massima differenza di *Monmonier* implementato in *BARRIER 2.2* (Manni et al. 2004). Le coordinate geografiche di ogni sito di campionamento sono state poi collegate attraverso la triangolazione Delaunay e ne è stato derivato il corrispondente diagramma Voronoï. È stato deciso poi di mantenere, tra le barriere geografiche ottenute, quelle con una robustezza maggiore al 50% ($P > 0,50$).

3. – **RISULTATI**

3.1 - **Diversità genetica e relazioni filogeografiche**

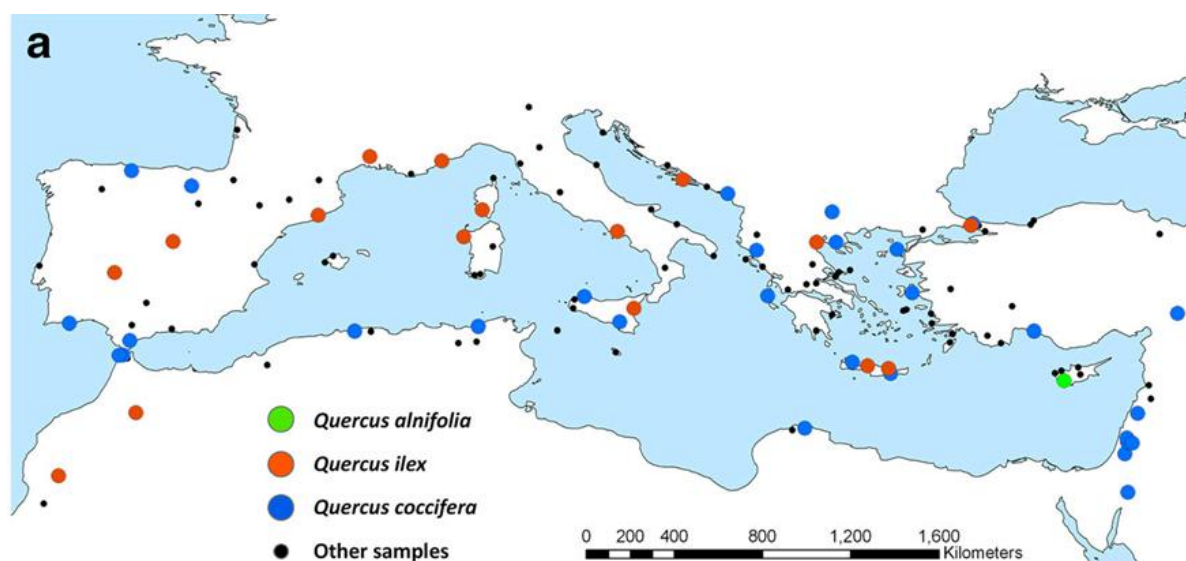
Il dataset finale è consistito in 124 sequenze per ognuna delle tre regioni plastidiali analizzate con le seguenti dimensioni: 743 bp per il gene *rbcL*, un frammento con una lunghezza tra le 692 e le 695 bp (695 pb in *Quercus baloot*) compreso tra la posizione 3'-trnK dell'introne ed una parte adiacente al gene *matK*, e lo spaziatore intergenico completo *trnH-psbA* con una lunghezza compresa tra le 547 e le 579 pb. Il multiallineamento ottenuto dai tre marcatori concatenati, ha formato una matrice totale di 2035 caratteri. All'interno di circa il 50% delle sequenze di *trnH-psbA* è stata trovata una inversione lunga 24 pb che è stata invertita e complementata. In totale, sono state osservate 42 sostituzioni e 10 *indels* lunghi da 1 a 14 bp [gli *indels* sono un evento di mutazione/ricombinazione che può far parte di due classi: una inserzione (*insertion*) o una delezione (*deletion*)]. Ne sono così derivati (Tabella 5) un elevato numero di siti variabili (S), di caratteri parsimoniosamente informativi (PICs), e alti livelli di polimorfismo nucleotidico (θw). La maggior parte di queste variazioni sono state osservate all'interno del frammento *trnH-psbA*, dove è stato rilevato anche il maggior numero di *indels* (*Q. alnifolia* e *Q. aucheri* non hanno mostrato nessun *indel*). I siti di variazione risultanti hanno generato 44 aplotipi totali (H), ricalcolati poi in 62 considerando i gaps, i quali hanno evidenziato un alto numero di diversità aplotipica (h) e diversità nucleotidica (π). Il dataset completo di dati mostra una “uncorrected p-distance” che va da 0 a 0.008, e tra le specie analizzate, *Q. coccifera* risulta essere la più variabile, infatti la sua diversità genetica intraspecifica (0.008) è pari alla massima diversità genetica interspecifica osservata all'interno di tutti i campioni; al contrario i parametri di diversità osservati in *Q. ilex* risultano essere i più bassi. I test di Tajima's e Fu's hanno prodotto invece risultati significativi solo nel dataset totale e in *Quercus coccifera*.

Dataset	N	L	p	H	h	S	PICs	θw	π	D	Fs
All species	124	2035	0,000 – 0,008	44 (62)	0,9361 (0,9671)	40	26	0,00397	0.00358	0,25802	14,086*
<i>Q. ilex</i>	58	2035	0,000 – 0,005	17 (26)	0,857 (0,9292)	18	12	0,00206	0,00195	0,22545	-2,830
<i>Q. coccifera</i>	58	2024	0,000 – 0,008	33 (42)	0,959 (0,98)	33	24	0,00386	0,00362	0,07605	-9,819*

<i>Q. alnifolia</i>	3	1992	0,000 – 0,002	2	0,667	3	0	0,00100	0,00100	n.d.	n.d.
<i>Q. aucheri</i>	5	2010	0,000 – 0,006	2	0,400	12	0	0,00290	0,00241	n.d.	n.d.

Tabella 5 – (N) numero dei campioni; (L) lunghezza allineamento (pb); (P) distanza non corretta (min-max); (H) numero di aplotipi considerati i gaps; (h) diversità aplotipica; (S) numero di siti polimorfici; (PICs) caratteri parsimoniosamente informativi; (θ_w) nucleotidi polimorfici; (π) diversità nucleotidica; (D, Fs) test statistici di Tajima e Fu; * significatività con $P < 0.01$

Per quanto riguarda gli aplotipi, ne sono stati rilevati in totale 42 in *Quercus coccifera*, 26 in *Quercus ilex*, due in *Quercus aucheri* e due in *Quercus alnifolia*; 53 di questi sono stati trovati in singole accessioni (29 in *Q. coccifera*, 16 in *Q. ilex* ed uno in *Q. alnifolia*) o sono risultati condivisi da individui della stessa specie (tre aplotipi in *Q. coccifera* e *Q. ilex*, uno in *Q. alnifolia*). Nove aplotipi invece, ovvero il 14.5% del dataset totale, sono risultati condivisi tra individui di specie diverse (sette tra *Q. coccifera* e *Q. ilex*, due tra *Q. coccifera* e *Q. aucheri*). Il numero totale di individui che condividono aplotipi in maniera interspecifica è elevato, sono infatti 61 (corrispondente ad un 49% del totale) e varia da uno, in ciascuna specie, a dieci in *Q. ilex*. Come mostrato in figura 29a, gli aplotipi unici si osservano nell'intera regione del Mediterraneo, mentre gli aplotipi condivisi sono limitati ad alcune aree come Cipro, la penisola iberica, il nord Africa, la Grecia occidentale, Turchia e Libano. Generalmente, gli aplotipi condivisi tra *Q. coccifera* e *Q. ilex* o *Q. aucheri* hanno differenti estensioni spaziali; infatti alcuni sono limitati a piccole isole, quali ad esempio Maiorca (Spagna) e Ikaria (Grecia), mentre altri sono ben distribuiti su grandi distanze geografiche (dalla Sardegna sud-occidentale e l'Italia al Mar Nero, dalla Sicilia occidentale e Sardegna ai Balcani, dall'est dell'Algeria e Marocco nord al sud-ovest della Francia) (Fig.29b-c).



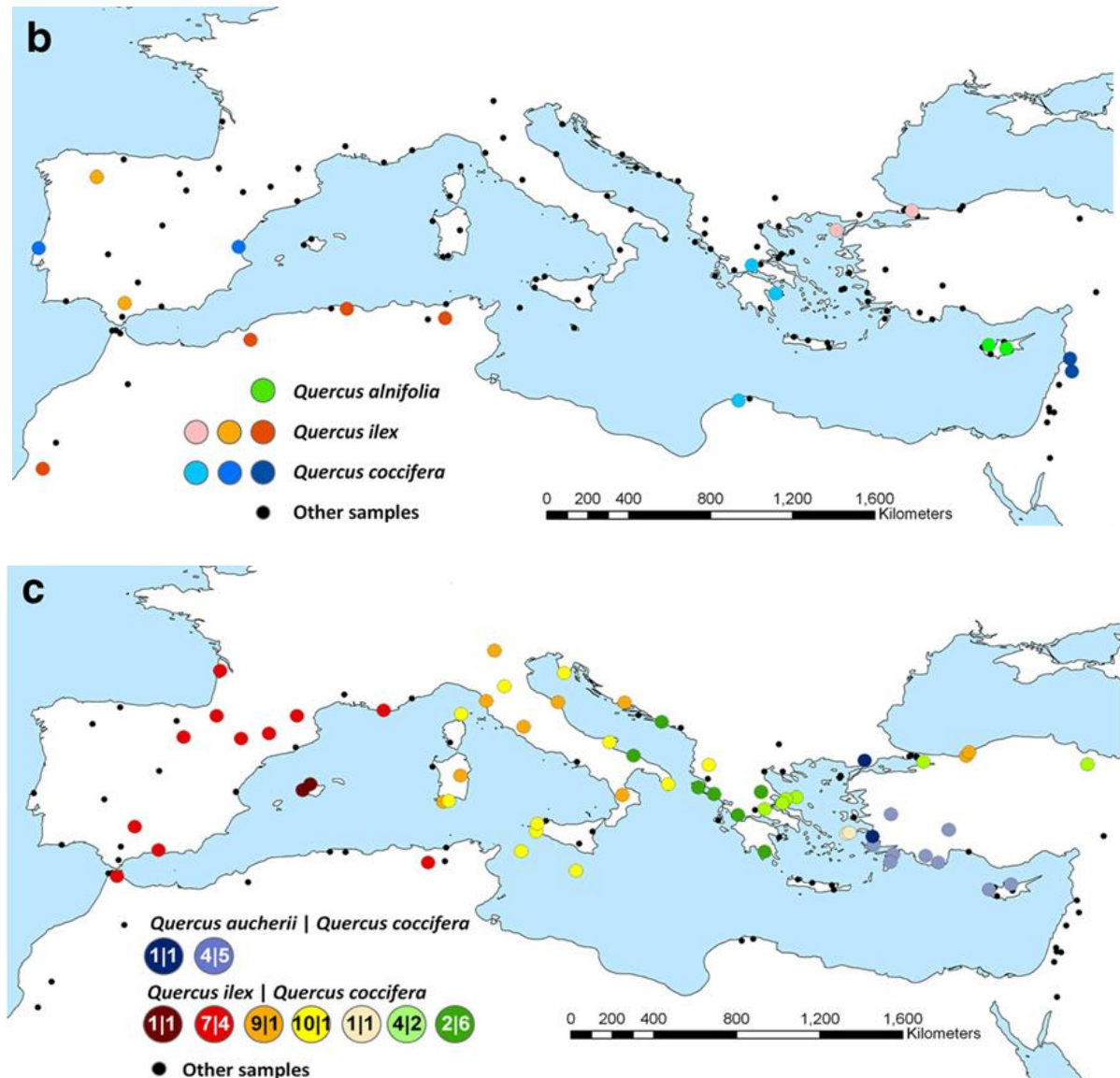


Fig. 29 - Distribuzione dei singoli campioni (a); condivisione intra- (b) ed interspecifica (c) di aplotipi

Le due coordinate principali ottenute dall'analisi della PCoA (Fig.30a), spiegano il 67.2% della variazione tra i dati analizzati; infatti possono essere facilmente distinti quattro grandi gruppi (I, II, IV, V) e due coppie di campioni isolati (gruppi III, VI). Nel dettaglio, si vede che i campioni sono stati raggruppati in base alla loro provenienza, indipendentemente da affiliazioni tassonomiche (Fig.30b, c). Il gruppo I comprende *Q. baloot*, *Q. floribunda*, 22 campioni di *Q. coccifera*, *Q. aucheri*, *Q. alnifolia* provenienti dal Medio Oriente (Giordania meridionale, Turchia occidentale e Cipro) corrispondenti alla discendenza di aplotipi "WAHEA" (Simeone et al. 2016); il gruppo II include 20 membri di *Q. ilex*, *Q. coccifera* e *Q. aucheri* provenienti dalla regione del Mar Egeo (Turchia occidentale, Grecia e isole dell'Egeo) corrispondenti agli aplotipi del tipo "Cerris-Ilex"

(Simeone et al. 2016); i gruppi III e VI riflettono la diversità aplotipica all'interno del lignaggio molto diversificato ed estremamente complesso definito 'Euro-Med', come già evidenziato da Simeone et al. (2016). I campioni del gruppo III (*Q. ilex* e *Quercus coccifera*) provenienti da Creta e Turchia occidentale, sembrano essere in qualche maniera collegati con il tipo "Cerris-Ilex". Il gruppo VI invece include due campioni quasi simpatrici di *Q. ilex* e *Q. coccifera* provenienti dalla Grecia nord-orientale, i quali risultano essere isolati ed equidistanti da tutti gli altri campioni del dataset. Trenta campioni di *Q. coccifera* e *Q. ilex*, provenienti dal Mediterraneo centrale (Malta, paesi balcanici, Italia, Sicilia, Sardegna, Corsica, sud della Francia, Tunisia e Algeria) risultano inseriti nel gruppo IV insieme a due campioni di *Q. ilex* provenienti dalla costa turca del Mar Nero. Il gruppo V, il più diffuso, comprende 48 campioni tra *Q. coccifera* e *Q. ilex* che si estendono dai Balcani al nord Africa fino alla penisola iberica. I gruppi ottenuti dall'analisi della PCoA possono essere perfettamente rintracciati nella network filogenetica (Fig.30b). Le parti centrali del grafico riflettono un elevato livello di segnale di disturbo, compatibile con la matrice delle distanze (molto ridotte) che lo ha prodotto. Ciononostante, viene fortemente enfatizzata la scissione generale tra "Euro-Med" (gruppi III-VI) e le altre due discendenze principali (gruppi I –II). Inoltre vengono evidenziati i segnali dei campioni provenienti dalla regione del Mar Egeo ed isolati dalla stirpe "Euro-Med" (gruppi III-VI) che apparentemente sembrano essere intermedi tra il lignaggio "Cerris-Ilex" ed "Euro-Med". Il grafico mostra anche la elevata omogeneità all'interno del gruppo "Cerris-Ilex", per lo più confinato nel Mar Egeo (gruppo II, Fig.30c), e la stretta relazione tra gli aplotipi di tipo "WAHEA" di *Q. alnifolia*, *Q. aucheri* e *Q. coccifera* del Mediterraneo orientale (gruppo I), con le querce dell'Asia centrale (*Q. baloot*, *Q. floribunda*, *Q. semecarpifolia*).

	Intragroup	Intergroup				
		I	II	III	IV	V
Group I ('WAHEA')	0.001					
Group II ('Cerris-Ilex')	0.001	0.005				
Group III ('Euro-Med')	0.001	0.005	0.003			
Group IV ('Euro-Med')	0.001	0.007	0.005	0.004		
Group V ('Euro-Med')	0.001	0.006	0.005	0.003	0.003	
Group VI ('Euro-Med')	0.001	0.004	0.003	0.005	0.004	0.003

Tab. 6 - Stime di divergenza media evolutiva su coppie di sequenze e nei sei gruppi di aplotipi identificati in questo studio.

Le distanze genetiche (uncorrected p-distance) infragruppo dei lignaggi di “WAHEA” (gruppo I) e “Cerris-Ilex” (gruppo II) sono risultate essere minori della divergenza misurata all’interno del gruppo “Euro-Med” (gruppo III-VI, 00.001 e 0.002 rispettivamente). Questo ultimo è risultato anche più differenziato dal gruppo “WAHEA” che non dal “Cerris-Ilex” (0.006and 0.005, respectively); al suo interno, i gruppi III e VI sono risultati più simili ai gruppi “Cerris-Ilex” e V (Tabella 6).

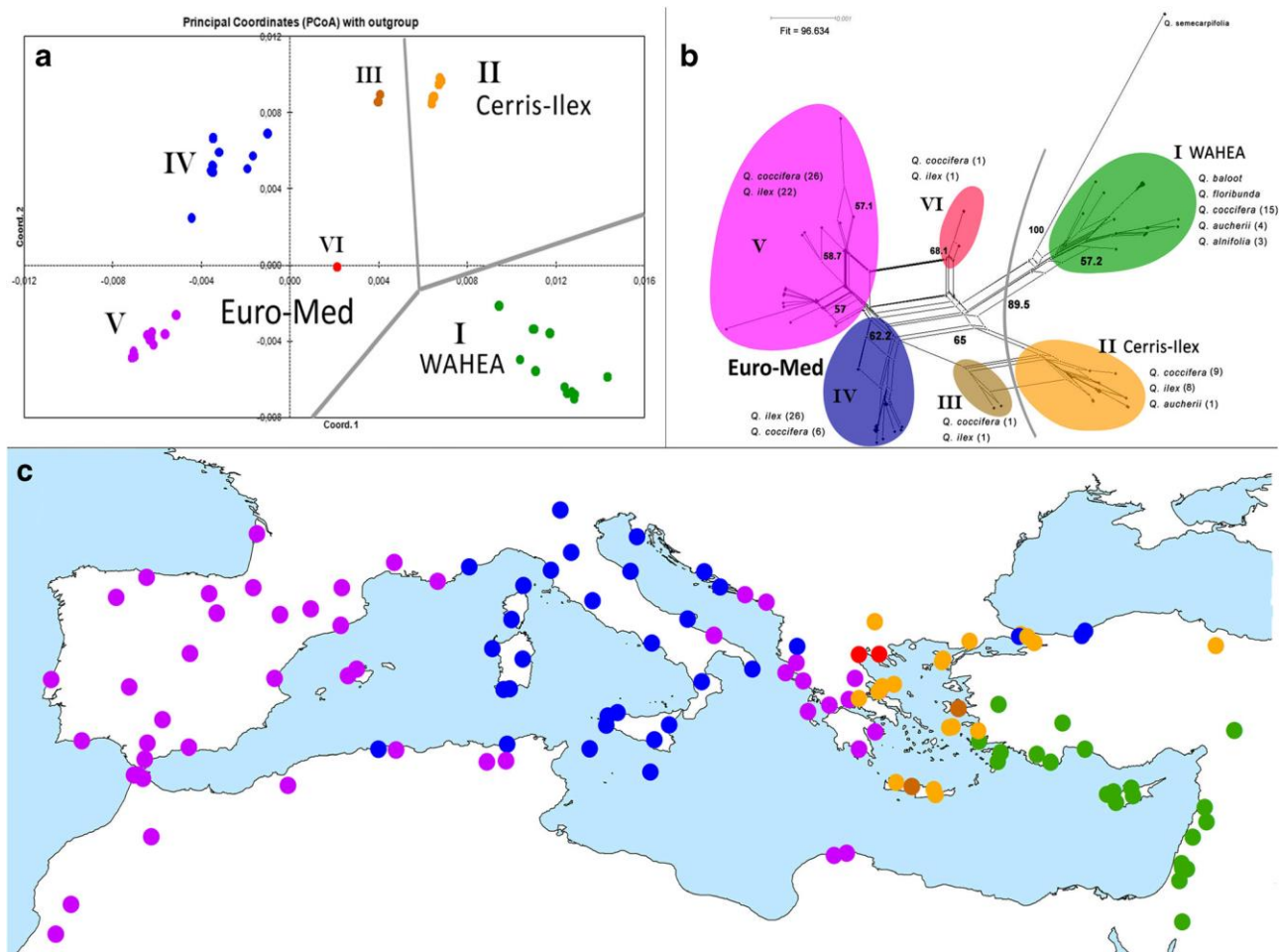


Fig. 30 - Analisi PCoA (a), Neighbour-Net delle relazioni filogenetiche (b) e distribuzione geografica dei gruppi identificati con le due analisi (c)

3.2 - *Struttura genetica spaziale*

Il Mantel test ha dimostrato che le distanze genetiche e il logaritmo naturale delle distanze geografiche (esprese in Km) tra i siti di campionamento di ogni specie (*Q. coccifera* e *Q. ilex*) non sono correlati ($r^2 = 0.191$ e 0.1335 , rispettivamente; $P=0.0002$) e che pertanto la divergenza genetica in entrambe le specie non può essere collegata a fenomeni di isolamento da distanza. Nella mappa di Genetic Landscape di *Q. coccifera* (Fig. 31a) i pattern individuati evidenziano le regioni Mediterranee caratterizzate da una divergenza genetica moderata (di colore giallo) ed elevata (di colore rosso). L'Anatolia meridionale ed il Medio Oriente sembrano essere piuttosto uniformi ma fortemente separati (cioè divergenti) da tutto il resto; lo stesso possiamo dire delle regioni che circondano il Mar Egeo ed il nord dell'Anatolia, mentre le popolazioni dei Balcani e della parte centro-occidentale del Mediterraneo sono relativamente meno divergenti. L'algoritmo di Monmonier implementato in BARRIER ha identificato cinque barriere genetiche statisticamente significative (ovvero con robustezza >50%), le quali coincidono esattamente con i pattern di diversità genetica. Le principali barriere genetiche (robustezza =100%) corrono attraverso l'Anatolia settentrionale ed occidentale, e dalla penisola balcanica sud-orientale lungo la costa occidentale dell'Egeo e nel mare di Creta. Ulteriori barriere minori (robustezza 52-58%) corrono invece tra le Baleari e la Sardegna, e dividono l'Anatolia del sud e Cipro dai campioni del Medio Oriente. Queste barriere riflettono sostanzialmente, la differenziazione intra-lignaggio tra "Euro-Med" (Mediterraneo occidentale) e "WAHEA" (Mediterraneo orientale).

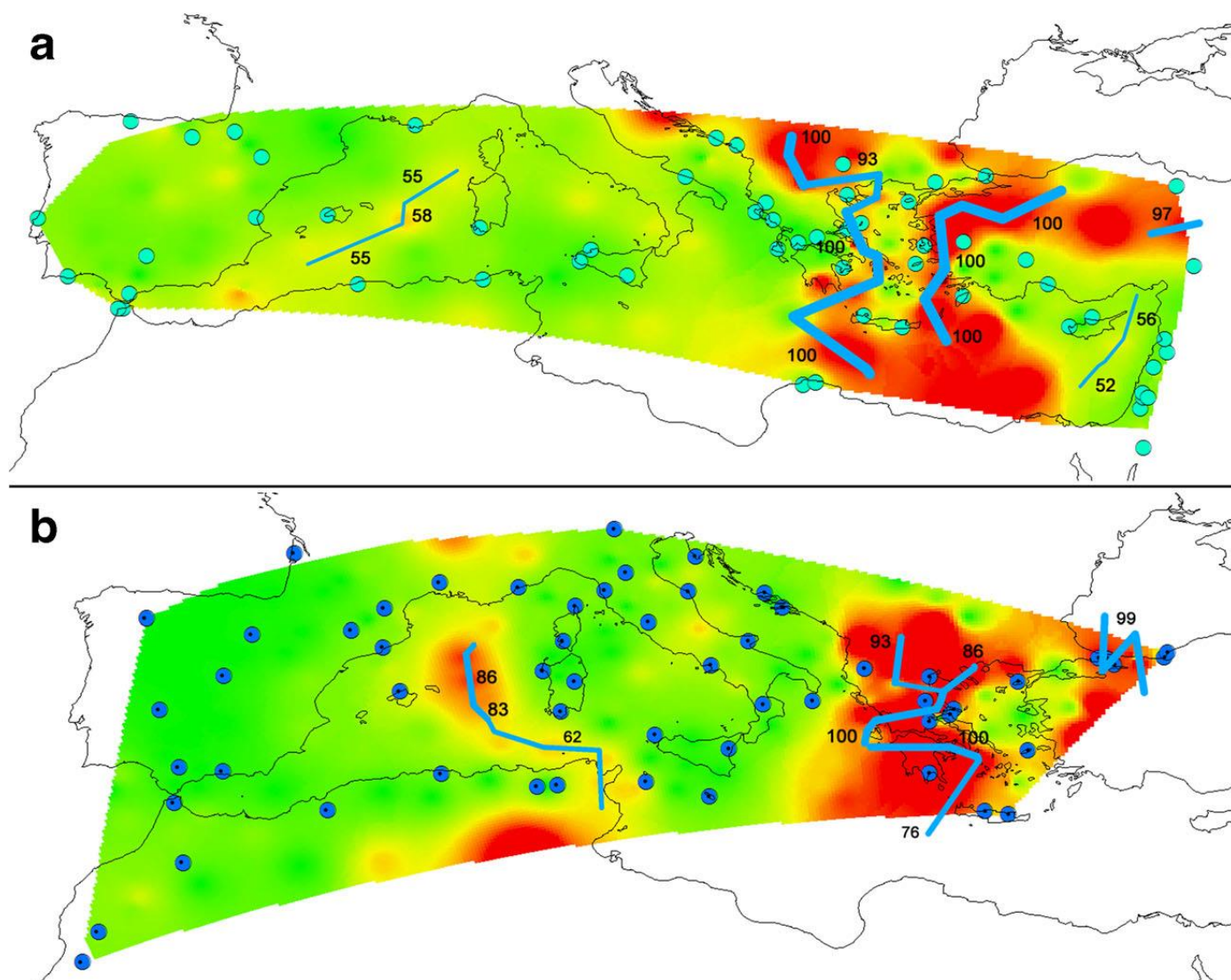


Fig. 31 - Risultati della Genetic Landscape in *Quercus coccifera* (a) e *Quercus ilex* (b). I colori indicano le aree con bassa divergenza genetica di specie (verde) ed alta divergenza (rosso). Evidenziate in blu le principali barriere geografiche significative (robustezza >50%)

La Genetic Landscape in *Q. ilex* (Fig.31b) ha mostrato dei risultati molto simili, con la delineazione di tre grandi aree divergenti: Mediterraneo occidentale, centrale ed orientale. L'area del Mediterraneo orientale ha una elevata diversità nei Balcani meridionali e nella regione del Mar Nero, con una certa omogeneità nelle terre intorno al Mar Egeo. Anche in questo caso, con BARRIER, sono state identificate cinque barriere genetiche statisticamente significative (robustezza > 60%), che coincidono esattamente con i valori di divergenza genetica derivanti dall'analisi di Genetic Landscape e mostrati nella mappa. Queste barriere corrono attraverso il Bosforo (a nord-ovest della Turchia), dal sud della penisola balcanica attraversando la Grecia da nord a sud (coinvolgendo le alpi Dinariche, il Pindo, i Monti Rodopi e il Peloponneso), e dal Mare delle

Baleari verso lo stretto di Sicilia. Entrambe le network aplotipiche ottenute per il lignaggio “WAHEA” (Fig. 32), calcolate con le regioni dei marcatori a bassa (*rbcL* + *trnK-matK*) ed alta divergenza (*trnH-psbA*), essenzialmente mostrano gli stessi risultati ottenuti con le mappe di Genetic Landscape e BARRIER: due gruppi aplotipici maggiori sono caratterizzati da vari individui di *Q. aucheri* e *Q. coccifera* del sud della Turchia (AU01-04, CO04, CO51), Rodi (CO10), e da individui provenienti dal Medio Oriente (i quali mostrano qualche variazione ulteriore con lo spaziatore intergenico *trnH-psbA*). Entrambi i lignaggi, con una condizione ancestrale altamente probabile, co-occorrono simpatricamente nell’area di Cipro (CO31, CO51), con la specie endemica *Q. alnifolia* (la quale mostra anche essa l’aplotipo del vicino Oriente).

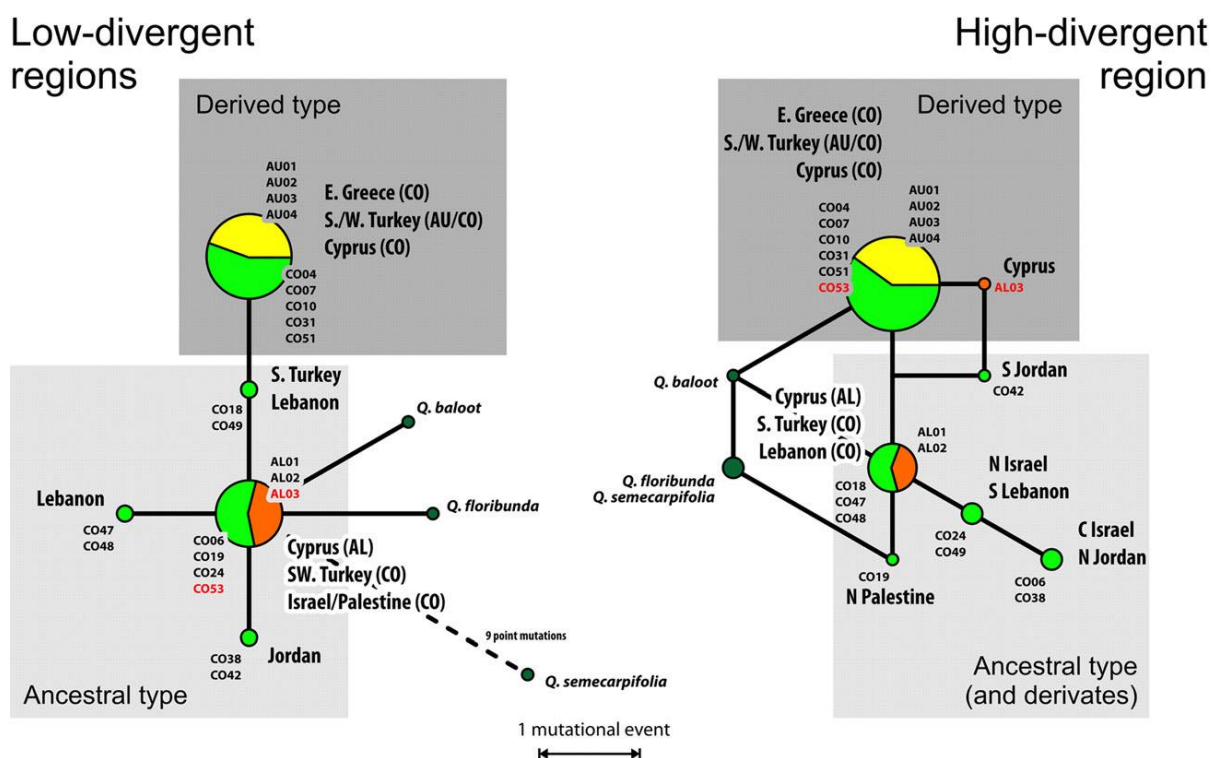


Fig. 32 - Network aplotipico derivato da regioni del marcatore a bassa (*rbcL* + *trnK-matK*) ed alta divergenza (*trnH-psbA*) nelle querce del gruppo *Ilex* del Mediterraneo con lignaggio “WAHEA”

Un segnale ambiguo, probabilmente ricombinante, è indicato da tre individui disgiunti di *Q. alnifolia* (AL03) e *Q. coccifera* (CO42, Petra, sud della Giordania, e CO53 Manavgat, sud-ovest della Turchia) evidenziati in rosso. Gli aplotipi tipici di “Cerris-Ilex” dell’Egeo (Fig. 33), mostrano pochissime variazioni, ma un pattern biogeografico molto chiaro. L’aplotipo più comune coinvolge la maggior parte degli individui di *Q. ilex*, *Q. coccifera* e *Q. aucheri*, che coprono il sud-ovest della regione del Mar Nero, le isole settentrionali dell’Egeo e la adiacente regione costiera di Grecia e

Turchia; tuttavia, questo è anche il più ancestrale rispetto agli aplotipi degli altri due lignaggi principali. Gli aplotipi presenti su alcune isole come Creta (CO14, CO57, IX53), Icaria (CO16, IX18) e Gokceada (CO54) possono invece testimoniare una certa deriva genetica a carico delle due specie.

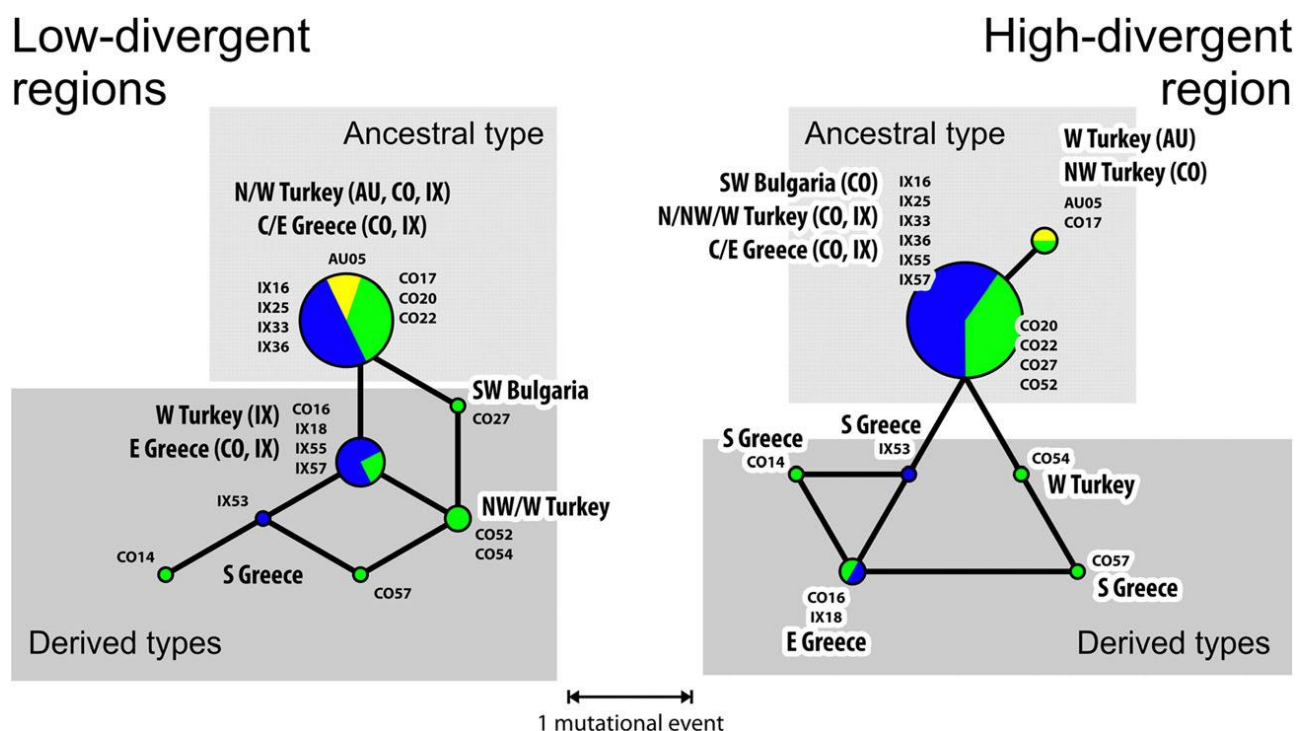


Fig. 33 - Network aplotipico derivato da regioni del marcatore a bassa (*rbcL* + *trnK-matK*) ed alta divergenza (*trnH-psbA*) nelle querce del gruppo *Ilex* del Mediterraneo con lignaggio “*Cerris-Ilex*”

Il lignaggio “Euro-Med” (Fig. 34) invece mostra pattern differenti e relazioni filogenetiche più complesse, soprattutto quando vengono confrontati i pattern di mutazione nelle regioni del marcatore con alta e con bassa divergenza. Tuttavia, entrambe le ricostruzioni sono in gran parte congruenti nel riconfermare i due principali gruppi ottenuti con l’analisi della PCoA e la Neighbour-Net (Gruppi IV e V) anche se abbiamo chiaramente un numero più elevato di aplotipi identificati con la regione ad alta divergenza. Un particolare che colpisce, osservando il grafico, è la sequenza nucleotidica dei due campioni del gruppo III (IX15, CO50) apparentemente isolati da tutto il resto (vedi Tabella 7). Le loro regioni geniche sequenziate hanno mostrato infatti quattro eventi mutazionali unici che li hanno portati a separarsi dal gruppo aplotipico “Euro-Med”; la lunghezza del segmento polimorfico a dominanza di timina, nell’introne *trnK*, li collega invece ai gruppi aplotipici “*Cerris-Ilex* e “*WAHEA*”; le mutazioni nella sequenza codificante del gene *matK* infine

appaiono condivise esclusivamente con “Cerris-Ilex”. Le mutazioni riscontrate nel frammento trnH-psbA dei due campioni del gruppo VI (IX44, CO32) sono condivise con gli aplotipi di “Cerris-Ilex”, mentre le sequenze delle altre regioni geniche sono poco appariscenti.

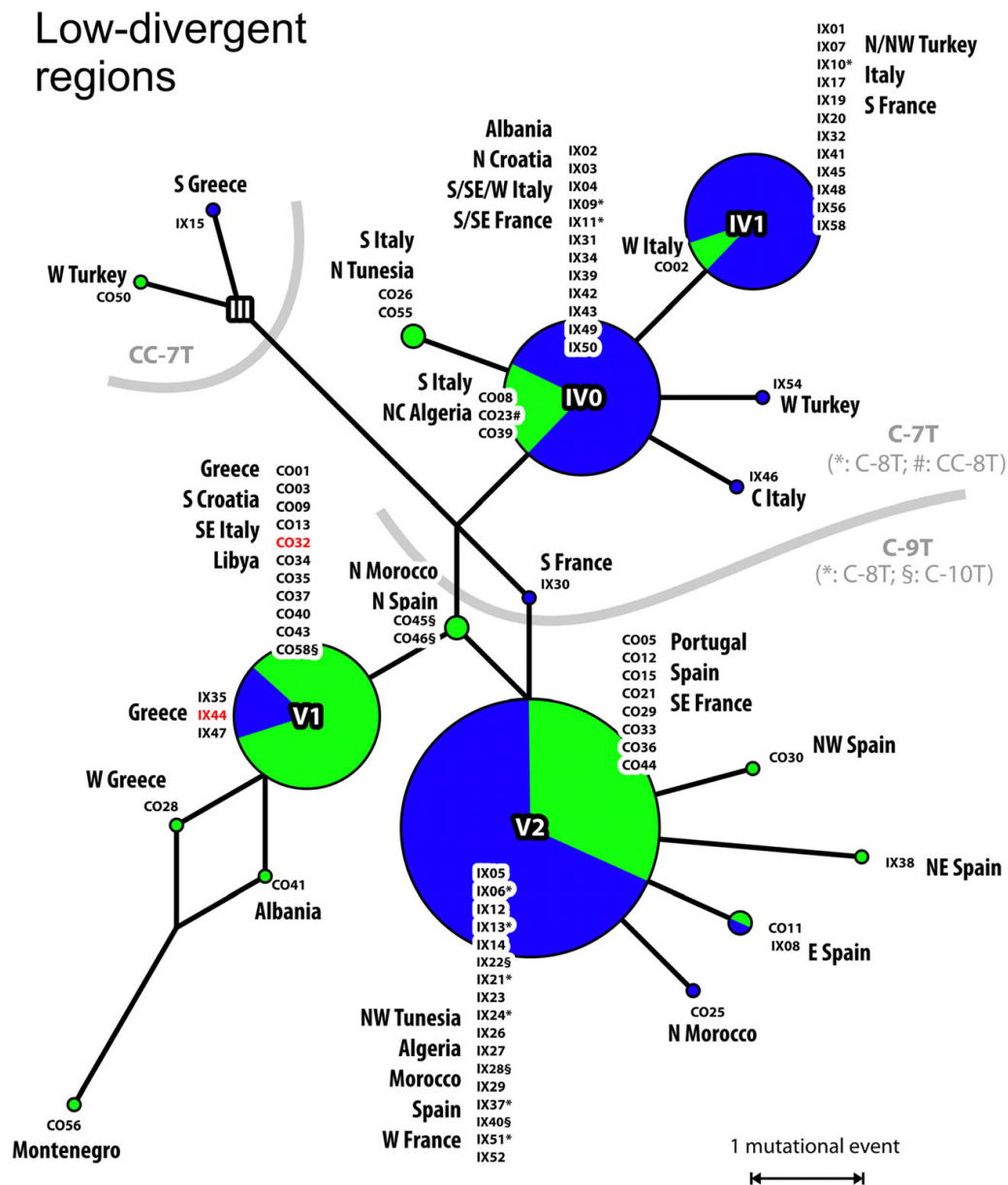


Fig. 34 - Network aplotipica derivata da regioni del marcatore rbcL + trnK-matK nelle querce del gruppo Ilex del Mediterraneo con lignaggio “Euro-Med”.

All’interno dei due maggiori gruppi (IV e V), le network indicano che il gruppo V, compreso tra il Mediterraneo occidentale e alcune regioni dei Balcani, ha avuto probabilmente origine in una regione che si estendeva dal nord Africa alla penisola iberica, con aplotipi ancestrali che ritroviamo

nel nord del Marocco e della Spagna (discendenza o sub-gruppo V2), le quali regioni ospitano inoltre la più alta diversità di aplotipi. Il gruppo V è relativamente più omogeneo, per lo più composto da *Q. coccifera* e tre individui greci di *Q. ilex*, e si estende anche nella parte orientale del Mediterraneo (sub-gruppo V1). Il gruppo IV mostra una minore deriva genetica ed occupa le regioni centrali del Mediterraneo (sud-est della Francia, Italia, Africa nord occidentale ed alcune parti dei Balcani). È dominato principalmente da campioni di *Q. ilex* e tre campioni sempre di *Q. ilex* dei climi umidi subtropicali del nord-ovest della Turchia (Bosforo e Mar Nero) (sub-stirpe IV1). Gli aplotipi del nord Africa di *Q. coccifera*, invece, possono probabilmente essere direttamente derivati da un evento mutazionale avvenuto nei parenti italiani più prossimi (sub-gruppo IV0), e lo stesso può valere per i campioni più settentrionali di *Q. ilex*, facenti sempre parte di questo gruppo, provenienti dalla Francia sud orientale.

Alignment position								
Sequence region	<i>trnK</i> intron	<i>matK</i> gene			<i>trnH-psbA</i>			
Alignment position	880–893	1177	1185	1201	1499	1522	1718	1875–1877
Haplotypes from lineages shared with group Cerris and (East) Asian members of group Ilex								
Group I ('WAHEA')	CCT ₇₋₉	C	C	C	C(T)	T	A	GT
Group II ('Cerris-Ilex')	CCT _{7(8, in a single accession)}	A	T	T	C(T)	T	T	GT
'Euro-Med' haplotypes, only found in <i>Q. coccifera</i> and <i>Q. ilex</i> of the Mediterranean Region								
Group III	CCT ₇	A	T	T	T	G	C	AAT
Group IV	CCT ₈ (singleton), CT ₇₋₈ (all other)	C/T	C	C	T(C)	G	C	AAT
Group V	CT ₇₋₁₀ , AT ₉	C	C	C	T	G	C	AAT
Group VI	CT ₉	C	C	C	C	T	T	GT

Tab. 7 - Modelli di mutazione dei frammenti *trnK-matK* e *trnH-psbA* ricostruiti nei sei gruppi aplotipici identificati

4. – DISCUSSIONI

Negli studi precedenti sulle specie appartenenti al gruppo oggetto di questo studio, i ristretti campionamenti effettuati nella regione orientale del Mediterraneo hanno ostacolato una valutazione completa delle strutture genetiche di *Quercus ilex*, in quanto sostanziali informazioni contenute in queste regioni sono venute a mancare (Lumaret et al. 2002; Petit et al. 2005; Lopez de Heredia et al. 2007); allo stesso tempo, la bassa risoluzione dei marcatori molecolari utilizzati (PCR-RFLP in de Heredia et al. 2007; allozimi in Toumi e Lumaret 2010) ha dato risultati poco informativi in *Q. coccifera*, oscurandone i pattern geografici.

Il presente lavoro ha puntato invece a colmare queste lacune, incrementando i campionamenti in tutte le specie del gruppo e in tutte le regioni del loro areale, utilizzando marcatori molecolari basati sulle analisi di sequenza del DNA e applicando metodi di elaborazione dei dati più moderni e più adatti agli obiettivi preposti. Come risultato sono stati ottenuti pattern filogeografici molto informativi e dettagliati per le specie analizzate, che hanno permesso di rivisitare ed ampliare le conoscenze acquisite sull'evoluzione di queste querce nel Mediterraneo. Più specificatamente, in accordo con gli studi pre-esistenti sono stati confermati i principali pattern regionali in *Quercus ilex* e la profonda divergenza di un pattern orientale di *Quercus coccifera*. Tuttavia però, sono state anche ulteriormente rinforzate e spazialmente dettagliate le profonde incongruenze tra i dati tassonomici e quelli plastidiali (Simeone et al. 2016), la estesa “non-monofilia” dei plastomi delle specie analizzate, ed una struttura geografica molto complessa, in cui le storie delle singole specie non possono essere separate. Per entrambe le specie *Q. ilex* e *Q. coccifera* vengono di conseguenza messi in discussione i modelli precedentemente proposti di graduale espansione est-ovest, sia in tempi passati (Petit et al. 2005) che in tempi più recenti (Toumi & Lumaret 2010).

4.1 - La diversità genetica nelle querce mediterranee del gruppo *Ilex*

Le distanze genetiche intra- ed interspecifiche complessive sono risultate piuttosto basse ($< 0,01$), e sembrano suggerire dei bassi tassi di evoluzione per il genoma cloroplastico nelle querce mediterranee del gruppo *Ilex*, o almeno sui loci osservati. Tuttavia, all'interno dell'intero genere *Quercus* e della famiglia delle Fagaceae in generale, il gruppo *Ilex* è risultato essere quello caratterizzato da un numero di aplotipi e dei valori di diversità genetica inusualmente elevati (Simeone et al. 2013, 2016).

Inoltre, la variazione genetica riscontrata è risultata ampiamente sufficiente per consentire l'individuazione di pattern geografici in larga parte congruenti con quelli di studi precedenti (Lumaret et al. 2002, Lòpez de Heredia et al. 2007). Infine, bisogna rilevare che altri importanti *taxa* legnosi circum-mediterranei hanno mostrato complessivamente dei livelli più bassi di diversità genetica basati su sequenze di DNA plastidiale, ad esempio *Olea* (Besnard et al. 2007), *Laurus* (Rodriguez-Sanchez et al. 2009), *Erica* (Dèsamoredé et al. 2011), *Myrtus* (Migliore et al. 2002), *Smilax* (Chen et al. 2004) e *Nerium* (Mateu-Andrés et al. 2015). Pertanto, i valori da noi incontrati sono da ritenersi elevati, anche se alcune differenze tra le quattro specie sono evidenti. Ad esempio, anche se probabilmente influenzata dalle ridotte dimensioni dei campionamenti, per quanto riguarda la bassa diversità genetica di *Quercus alnifolia* possiamo certamente dire che questa è in linea con il suo status di specie relitta ed endemica. Invece, le differenze riscontrate tra il leccio e la quercia spinosa sono più complicate da spiegare. A questo proposito, bisogna notare che la non significatività del test di Tajima (coerente con dinamiche di popolazione in riduzione), e soprattutto i valori fortemente negativi e significativi del parametro F_s di Fu riscontrati in *Q. coccifera* (ritenuto infatti più sensibile di D nel rilevare l'espansione/riduzione delle popolazioni se il campionamento è ridotto; Ramos-Onsins e Razas 2002) puntano ad indicare una situazione di riduzione demografica molto probabile in *Q. ilex*, al contrario di *Q. coccifera*.

Il basso range di espansione osservato per *Q. ilex* può probabilmente corrispondere ad una diminuzione demografica della specie causata da ricorrenti oscillazioni climatiche nel Mediterraneo con una crescente aridità a partire dal Pliocene (circa 5,3-2,6 milioni di anni fa). Infatti, in contrasto con gli adattamenti alla siccità propri di *Q. coccifera*, *Q. ilex* è una specie essenzialmente meso-mediterranea (Barbero et al. 1992; Quézel e Médail 2003). Inoltre, Menitsky (2005) ha osservato che il leccio probabilmente è stato presente nel Medio Oriente fino al secolo scorso (principalmente in Siria e Libano), ed è invece, ad oggi, scomparso, o diventato addirittura quasi sporadico in molte regioni dell'Egeo. L'effetto della riduzione genetica potrebbe essere stata rinforzata anche dagli alti tassi di propagazione vegetativa di cui è capace la specie, a seguito di modifiche ambientali operate dall'uomo, tra cui lo sfruttamento eccessivo delle foreste (Blondel 2006). *Quercus coccifera* invece, sembra essere stata meno influenzata, grazie al suo xeromorfismo più accentuato e ad una maggiore resistenza agli ambienti disturbati. Inoltre è stato osservato da Lumaret et al. (2002), che nel processo di ibridazione tra queste due specie, l'introggressione è solitamente unidirezionale, con *Q. ilex* predominante in qualità di specie madre, e *Quercus coccifera* come donatrice di polline; pertanto l'introggressione asimmetrica e l'acquisizione degli aplotipi di *Q. ilex* da parte di *Q. coccifera*, potrebbero aver aumentato la diversità genetica di questa a scapito della prima. Per esempio, sulla base del numero di individui coinvolti e sulle analisi aplotipiche (fig. 29-30-31-32-

33-34), appare molto probabile che le popolazioni sarde e siciliane di *Q. coccifera* abbiano “ottenuto” aplotipi del gruppo IV (H6, H28, CO02, CO39) dalle popolazioni di *Q. ilex* locali, via introgressione. Analogamente, gli individui greci di *Q. ilex*, con aplotipo del gruppo V (H5, IX35, IX47 altrimenti limitati a *Q. coccifera*), possono stare ad indicare un fenomeno di introgressione reciproca. In alternativa, l'aplotipo di un individuo di *Q. ilex* greco, potrebbe aver avuto introgressione dalle popolazioni locali di *Q. coccifera* e poi essersi propagato nella regione adriatica e nel sud-est dell'Italia. In generale, sembra molto probabile che *Q. coccifera* abbia una maggiore capacità di introgressione e propagazione dell'aplotipo durante le estati calde e secche delle regioni del Mediterraneo.

In ogni caso, i valori di variabilità genetica più elevati di *Q. coccifera* rispetto a quelli di *Q. ilex* sono concordanti con le loro differenti distribuzioni geografiche, la diversa resistenza ai disturbi degli habitat ed il maggiore numero di zone potenziali di contatto (presenti e passate) di queste specie tra loro e con altre specie (ad es., *Q. aucheri* e *Q. alnifolia*, ma anche *Q. suber*; de Heredia et al. 2007).

4.2 - Pattern di diversità aplotipica

La presenza di aplotipi condivisi tra le varie specie di querce è un fenomeno ormai ben consolidato (Petit et al. 2002). Gli scambi clorotipici tra querce interfertili sono stati dimostrati infatti tramite lo studio dei nucleosomi in diverse gruppi di specie, come ad esempio le querce bianche europee (*Quercus* gruppo *Quercus*) (Cortu et al. 2007; Valbuena-Carabaña et al. 2007; Lepais et al. 2009), le querce sempreverdi Nord Americane del gruppo *Quercus* (*Quercus subsection Virentes*) (Eaton et al. 2015), e le querce rosse (*Quercus* gruppo *Lobatae*) (Moran et al. 2012; Valencia-Cuevas et al. 2015). Nel nostro gruppo di riferimento, gli ibridi e diversi livelli di introgressione genetica tra individui morfologicamente puri, sono stati molecularmente documentati in *Quercus ilex/Quercus coccifera* (Ortengo e Bonal 2010) ed in *Quercus aucheri/Quercus alnifolia* (Neophytou et al. 2011b). Pertanto, i complessi pattern plastidiali ottenuti sia in *Quercus coccifera* che in *Quercus ilex* non ci devono sorprendere (vedi anche Lopez de Heredia et al. 2007). Anche il nucleosoma mostra firme genetiche altamente complesse, e varianti identiche di sequenza degli spaziatori ribosomali nucleari (spaziatore trascritto interno 1 e 2 di 35S rDNA; 5S spaziatore intergenico) è comunemente condivisa tra gli individui di *Quercus ilex* e quelli di altre specie. Le specie che mostrano i più alti livelli di diversità all'interno delle querce occidentali euroasiatiche e dei loro

parenti più stretti sono *Quercus aucheri* e *Quercus coccifera*. Al contrario *Quercus alnifolia* è caratterizzata da una variante unica dello spaziatore (Denk e Grimm 2010).

Le possibili spiegazioni per questa evidente “non monofilia” plastidiale (dovute ad esempio a fenomeni di “*incomplete lineage sorting*”, di introgressione unidirezionale o a fenomeni di speciazione recente), sono state ampiamente discusse da Simeone et al. (2016). Ad ogni modo, distinguere gli effetti di questi fenomeni può essere estremamente complicato (se non impossibile) senza l’ausilio di marcatori molecolari nucleari da utilizzare come confronto (Funk & Omland 2008). Per quanto riguarda lo studio presente, dobbiamo certamente notare come, in generale, la vicinanza geografica degli aplotipi condivisi tra specie diverse sia maggiormente indicatrice di fenomeni di introgressione locale piuttosto che di eredità casuale di tratti ancestrali (Hare e Avise 1998, Masta et al. 2002). Pertanto, considerando la distribuzione degli aplotipi condivisi, quelli riscontrabili in Sardegna e Sicilia (H6, H28) e nella parte orientale della Grecia (H5), risultano essere probabilmente derivanti da introgressione da parte di *Q. coccifera* in *Q. ilex*. Sono difficili da spiegare, tuttavia, gli aplotipi condivisi e trovati unicamente in Ikaria e nell’isola di Maiorca, e quelli condivisi tra le due specie su estensioni geografiche molto grandi. Quest’ultimo fenomeno può essere maggiormente indicativo del fenomeno di “*incomplete lineage sorting*” di caratteri ancestrali (Simeone et al. 2016), anche se non può essere escluso un fenomeno di introgressione occasionale a seguito di eventi di lunga dispersione tra *Q. coccifera* e *Q. aucheri* (esempio H12) (Lumaret et al. 2002; Toumi e Lumaret 2010). D’altra parte, fenomeni recenti di speciazione o mera variazione interspecifica entro *Q. coccifera* (Zohary 1961), potrebbero spiegare l’assenza di aplotipi specifici in *Q. aucheri*, anche se chiaramente sarebbe necessario ampliare il numero di individui campionati ed utilizzare marcatori multipli, per ottenere una caratterizzazione più completa di questo *taxon*. In ogni caso, le distribuzioni relative ai singoli aplotipi inter- ed intraspecifici, sono piuttosto omogenee all’interno di tutto il gruppo, e le zone di ibridazione potenziali tra querce (oltre alla Sardegna, Sicilia, Balcani e la costa anatolica occidentale) sembrano essere distribuite in quasi tutto il Mediterraneo.

4.3 - Relazioni filogeografiche

La forte correlazione osservata tra gli aplotipi plastidiali e la distribuzione geografica è ormai un fenomeno ben noto sia nelle querce (Gugger e Cavender-Bares 2013, Simeone et al. 2013) che in altre specie arboree (Acosta e Premoli 2010; Lei et al. 2012). Tuttavia, questo studio è forse il primo a descrivere più nel dettaglio questo fenomeno prendendo in considerazione un intero gruppo

tassonomico lungo tutto il suo areale Mediterraneo. I risultati ottenuti hanno permesso di distinguere quattro grandi aree geografiche che ospitano discendenze genetiche ben distinte (Fig. 29): (1) il Medio Oriente e il sud dell'Anatolia, (2) la regione dell'Egeo, (3) il Mediterraneo centrale (Francia sud-orientale, Italia, Africa nord-orientale), e (4) il Mediterraneo occidentale (Francia sud-occidentale, penisola iberica, Africa nord-occidentale). I *cluster* individuati in questo studio, coincidono con le regioni principali del Mediterraneo riconosciute esser state in passato delle macro-aree per rifugi glaciali (Médail e Diadema 2009), e ciò suggerisce che, sebbene le oscillazioni climatiche avvenute nel Pleistocene abbiano stimolato la diversificazione locale intra-gruppo, la formazione di queste linee genetiche è iniziata molto prima. Questo è risultato evidente nel nostro dataset, osservando l'aplotipo generale condiviso tra individui di zone disgiunte, come il Mediterraneo occidentale e centrale, delle popolazioni adriatiche meridionali, e che ritroviamo anche in alcuni individui del Mar Egeo e nelle regioni a nord-ovest della Turchia. Ciò porta a dedurre quindi che le querce sclerofille del gruppo *Ilex* fossero già presenti nella regione del Mediterraneo orientale a partire dal Miocene inferiore, come anche testimoniato dai principali ritrovamenti di macrofossili proprio in queste aree (Paicheler e Blanc 1981, Velitzelos et al. 2014). E' quindi molto probabile che alcune delle più complesse linee genetiche osservate di fatto riflettano i processi di speciazione e differenziazione precedenti il Quaternario. Membri più mesici del gruppo *Ilex* (oggi scomparsi) potrebbero avere superato la nascita del clima mediterraneo (3.2 milioni di anni fa), e potrebbero essere stati alla base dell'origine ed evoluzione di *Q. ilex* (Fig.30,31,32). Allo stesso tempo, nuove specie si sarebbero evolute o sono migrate all'interno del Mediterraneo da est (come *Q. coccifera*, Fig. 30,31,32,33), partecipando così alla creazione ed alla successiva espansione di comunità di piante sclerofille, grazie ad adattamenti xerofili ed altre caratteristiche quali la plasticità fenotipica, la longevità e la capacità di germinazione tramite dispersione zoofila (Herrera 1992). Conclusioni simili sono state derivate anche in studi precedenti, insieme a teorie molto generali basate su modelli di espansione graduale a partire dal tardo Miocene (Petit et al. 2005), di vicarianza indotta dal clima del Pliocene (López de Heredia et al. 2007), o da isolamento genetico più recente delle popolazioni (Toumi e Lumaret 2010). Il nostro studio si aggiunge così a questo corpo molto generale di conoscenze fornendo nuovi dati e analisi spaziali che mostrano come tutte le strutture genetiche delle specie in esame siano strettamente collegate, interdipendenti e legate alla complessa formazione del bioma Mediterraneo.

In particolare, in base alla distribuzione dei gruppi della PCoA e secondo le analisi spaziali eseguite, i tre principali lignaggi aplotipici all'interno delle querce del gruppo *Ilex* ("WAHEA", "Cerris-Ilex", "Euro-Med") sono confermate e dettagliate attraverso tutto il Mediterraneo, ed è evidente inoltre una forte frammentazione del pool genetico nel Mediterraneo orientale. Le regioni

del Mediterraneo centrale ed occidentale sono invece caratterizzate da una frammentazione molto meno marcata e, possibilmente, riflettono in qualche modo anche casi di introgressione recente di *Q. ilex* in *Q. coccifera*.

Più in dettaglio, la regione inclusa tra il sud dell'Anatolia ed il Medio Oriente ha agito come un rifugio ed un centro di diversificazione per le specie e gli aplotipi più strettamente legati all'originale gruppo ancestrale del querce del gruppo *Ilex*, corrispondenti al gruppo "WAHEA". L'Egeo e l'adiacente regione del Mar Nero, centro di presenza della discendenza "Cerris-Ilex" ma anche di diverse varianti distinte di aplotipi del tipo "Euro-Med", ha agito come un ulteriore centro di diversificazione e da snodo (attraverso i Balcani o sul Mar Ionio) verso le regioni del Mediterraneo centrale od occidentale. A sua volta, la parte occidentale (inclusa la penisola iberica, la Francia occidentale e l'Africa nord occidentale) e centrale del Mediterraneo (inclusa la zona settentrionale dei Balcani, Francia sud-orientale, Italia e Africa nord orientale) sono state sede di differenziazione di vari aplotipi più o meno diversi, tutti raggruppabili entro la discendenza "Euro-Med". Aree di contatto tra tutte le varie discendenze sono identificabili nelle regioni del Mar Egeo e lungo le coste del Mar Nero; altre aree di contatto tra i gruppi filogenetici entro il tipo "Euro-Med" sono le regioni tirreniche (per *Q. ilex*: Francia del sud; per *Q. coccifera*: Sicilia e Sardegna) e l'Africa settentrionale (per *Q. coccifera*: Algeria nord orientale).

4.4 - Sottostrutture regionali

La regione del Mediterraneo è stata ripetutamente riconosciuta come la sede di diversi processi di vicarianza avvenuti in varie specie arboree mediterranee, ed antecedenti al Quaternario. La frammentazione della Tetide durante il Miocene (Magri et al. 2007), i cambiamenti climatici cominciati nel tardo Miocene-Pliocene (Chen et al. 2014) e l'isolamento a causa delle distanze geografiche (Rodriguez-Sanchez et al. 2009), sono stati suggeriti come potenziali forze causanti l'interruzione del flusso genico e la conseguente divergenza tra popolazioni in altre specie circum-mediterranee (Nieto Feliner 2014). Questi processi hanno prodotto dei chiari pattern filogeografici molto simili a quelli rilevati in questo lavoro, anche se l'elevata divergenza plastomica all'interno del gruppo *Ilex* e le intense relazioni condivise tra le specie ed altri gruppi di querce, indicano uno scenario all'interno del quale il fenomeno della suddivisione incompleta dei caratteri ("*incomplete lineage sorting*") e dell'introgressione asimmetrica tra i gruppi ancestrali, hanno probabilmente giocato un ulteriore ruolo chiave. E' inoltre probabile che ripetute ondate di colonizzazione (verso

ovest e verso est), probabilmente iniziate nel Pleistocene a causa dei cambiamenti climatici, abbiano contribuito ad uno stratificarsi di diversità genetica con il risultato di rendere la ricostruzione ancora più complicata (vedi ad esempio quanto riportato in *Myrtus* da Migliore et al. 2012).

Ad ogni modo, le analisi effettuate con la Landscape Genetics e con BARRIER (Fig. 31), consentono di stabilire un modello di colonizzazione (seppur ancora generale) ed una probabile collocazione temporale. Infatti, le due analisi hanno mostrato come le interruzioni di migrazione dei principali aplotipi coincidano con le catene montuose dell'Anatolia, Grecia ed i Balcani, con il Mar Mediterraneo centrale (Mar di Sardegna) ed il Mar Egeo meridionale (Mar Libico). Il bacino del Mediterraneo è circondato infatti da una serie di catene montuose (il Rif, la catena Appenninico-Maghrebide, la Cordigliera Betica, i Pirenei, le Alpi Dinariche, i Monti del Tauro e la catena Anatolica) le quali hanno agito come centri di diversificazione o come barriere per il flusso genico sin dalla loro origine (Thompson 2005), ovvero legata all'orogenesi Alpina e completata poi nel Pliocene (Popov et al. 204). Ad esempio, la forte divisione tra gli aplotipi dell'Egeo e delle coste del Mar Nero di *Q. aucheri*, *Q. coccifera* e *Q. ilex* (Fig.30) rispetto al gruppo del Mediterraneo orientale di *Q. coccifera-aucheri-alnifolia*, rispecchiano la cosiddetta "Diagonale Anatolica" (Davis 1971), che altro non è che una linea di catene montuose che corrono attraverso l'Anatolia, dalla parte orientale dei monti del Ponto, fino ai Monti del Tauro occidentali. Questa è stata già riconosciuta come una barriera geografica molto significativa, che ha modellato la filogeografia di diverse specie animali e vegetali in tutta la Turchia (Bilgin 2011; Kapli et al. 2013) fin dalla sua origine geologica avvenuta nell'Eocene (Popov et al. 2004). Durante alcune fasi del Miocene poi, Cipro è stata collegata con il sud dell'Anatolia (Robertson 1998). Un'altra divisione genetica ben distinta si può adattare anche ad un'altra importante divisione floristica, la cosiddetta "linea di Rechinger" (Rechinger 1943). Questa linea separa la Grecia e le isole del Mar Egeo dalla Turchia, Rodi e l'Asia occidentale, fungendo da barriera alla migrazione delle piante ed al flusso genico (Bittkau e Comes 2005; Rodriguez-Sanchez et al. 2009; Gaudel et al. 2016), ed è stata collegata al periodo geologico del Miocene e dell'alto Pliocene (Greuter et al. 1986; Bittkau e Comes 2005). L'area del Mar Egeo (Creta compresa), collegata alla Grecia continentale dai numerosi ponti di terra durante il periodo di "Crisi salina" nel Messiniano (5,93 – 5,33 milioni di anni fa), fu poi isolata dopo il ri-allagamento del bacino del Mediterraneo (occidentale e centrale) nel periodo del Pleistocene (Steininger e Rogl 1984). Le discontinuità genetiche identificate a nord e ad ovest della Grecia separano le discendenze Egee di *Q. ilex-coccifera* (gruppo II "Cerris-Ilex" e gruppo III e VI "Euro-Med") dai principali gruppi all'interno del tipo "Euro-Med" (gruppo IV e V) e sono collegati a ulteriori catene montuose (quali i Balcani e l'arco ellenico) che erano già presenti nel periodo geologico dell'Oligocene ed hanno poi acquisito la loro attuale configurazione nel Pleistocene

(Krijgsman 2002). E' perciò lecito ritenere che l'isolamento dei tre lignaggi sia iniziato a partire dal Miocene/Pliocene.

Purtroppo, dedurre invece una sequenza di colonizzazione nel Mediterraneo occidentale e centrale coerente è molto più difficile. Le relazioni aplotipiche attraverso il Mar Adriatico, il Canale di Sicilia e tra la Corsica, Sardegna, Italia nord occidentale e Francia sud occidentale costituiscono ormai dei collegamenti ben noti per *Q. ilex* e *Q. coccifera* (Petit et al. 2005; Toumi e Lumaret 2010), riportabili all'emersione di ponti di terra facilitata da ripetuti cambiamenti del livello del mare durante il Pleistocene (Nieto Feliner 2014). Questi ponti avrebbero consentito una certa omogeneizzazione tra le diverse regioni e impedito l'insorgere di deriva genetica. Sul lato più occidentale del Mediterraneo, lo stretto di Gibilterra avrebbe costituito un'ulteriore barriera permeabile per entrambe le specie, come dedotto dal fatto che gli aplotipi osservati nella penisola Iberica e nell'Africa del nord costituiscono un gruppo filogenetico unico per entrambe le specie, ed un aplotipo (H12) è stato ritrovato su entrambi i lati dello Stretto. Una serie di studi riguardanti altre specie vegetali e animali ha rilevato che questo stretto non è stato causa di interruzione del flusso genico tra popolazioni africane e iberiche in entrambe le direzioni, nonostante l'aumento di deriva genetica che è stato rilevato in alcuni casi, in entrambe le regioni (Hewitt 2011).

Dopo aver prodotto uno schema filogeografico simile a quello ottenuto in questo lavoro, Petit et al. (2005) conclusero che *Q. ilex* aveva colonizzato la penisola Iberica dal nord Africa, passando attraverso la penisola Italiana. Invece, nel nostro studio *Q. ilex* ha mostrato quattro gruppi filogenetici ben distinti entro la discendenza "Euro-Med" (cioè i gruppi III-VI) (Fig.34), con ulteriori aplotipi sparsi nel Mediterraneo orientale. Gli aplotipi italiani appartengono al gruppo IV, ed hanno una distribuzione disgiunta anche lungo le coste del Mar Adriatico e in Turchia nord occidentale (Mar Nero, Mar di Marmara e regioni costiere). Nessun aplotipo del gruppo IV di *Quercus ilex* si trova più ad ovest della confinante Francia meridionale e della Sicilia; invece, le uniche forme plastidiali del gruppo V, presenti nella penisola iberica e raccolte più ad oriente di questa sono rappresentate da un unico aplotipo (H05; IX35; IX47), in comune con un gruppo di individui di *Q. coccifera* dei Balcani e della Grecia. Tipi intermedi non sono conosciuti. I nostri dati indicano quindi che gli aplotipi di *Q. ilex* presenti nella penisola italiana (gruppo IV) sono chiaramente distinti dalla gruppo filogenetico occidentale (gruppo V), ed entrambi rappresentano lignaggi evolutisi indipendentemente dal comune ancestore, o più popolazioni ancestrali, del tipo "Euro-Med" (Fig.34). Pertanto, considerando tutte le prove disponibili (Petit et al. 2005; questo studio), l'interpretazione più probabile è che il gruppo filogenetico IV di *Quercus ilex* potrebbe essersi evoluto da un progenitore ormai estinto; la sua origine potrebbe essere ricondotta al Mar Nero, ed il suo rifugio principale, durante le varie vicissitudini climatiche del Mediterraneo,

potrebbe essere stata l'Italia meridionale, da dove avrebbe poi colonizzato tutto il resto dell'Italia, la Francia sud orientale e la regione adriatica, ma non la penisola Iberica. Quest'ultima è stata molto più probabilmente colonizzata da popolazioni geneticamente diverse, provenienti da rifugi più antichi situati nel nord Africa o nel sud della Spagna.

Per quanto riguarda *Q. coccifera*, la struttura filogeografica estremamente chiara ottenuta con la Landscape Genetics e con BARRIER (Fig. 31), riflette principalmente la sua differenziazione nei tre lignaggi principali caratteristici delle querce Mediterranee del gruppo *Ilex* (Fig. 30), strettamente legata alla storia topo-geografica dell'Eurasia occidentale/Mediterraneo orientale del pre-Pleistocene, ed alla elevata capacità di ibridazione delle querce. Nessun ostacolo alla migrazione di questa specie sembra essere stata attiva invece nel Mediterraneo centro-occidentale, il che probabilmente rispecchia la presenza antica di questa specie nel Mediterraneo, la sua elevata adattabilità alle condizioni xeromorfiche e agli ambienti disturbati che sono andati aumentando dal Pleistocene ad oggi. Ad ogni modo, data la sua propensione ad agire da impollinatrice con tutta la serie di specie sorelle, solo uno studio approfondito dei segnali molecolari derivanti da nucleo e citoplasma di *Q. alnifolia*, *Q. aucheri* e *Q. ilex* lungo tutto il Mediterraneo potrebbero chiarire in maniera definitiva la storia biogeografica di *Quercus coccifera*.

5. – CONCLUSIONI

L'insieme delle prove fossili più chiare ed affidabili (discusse in Simeone et al. 2016) consente l'interpretazione delle più probabili dinamiche evolutive delle querce sempreverdi del gruppo *Ilex* attraverso il Neogene. Durante il Miocene e Pliocene, *Quercus drymeja* Unger e *Quercus mediterranea* Unger, erano due specie, ben distinte, di querce rapportabili al gruppo *Ilex*, inclusi alcuni morfotipi trovati tutt'oggi in *Q. ilex* e *Q. coccifera*. Esse erano molto ben rappresentate nelle comunità vegetali dell'Eurasia occidentale e della Paratetide (Kovar-Eder et al. 2004; Velitzelos et al. 2014). La regione centro orientale del Mediterraneo-Paratetide appare quindi come il centro di radiazione più altamente probabile per questo gruppo di querce (Denk et al. 2012; Veltzel et al. 2014). Tutti i dati genetici raccolti in questo studio indicano che il gruppo *Ilex* del Mediterraneo si è probabilmente originato da una suddivisione del pool genetico presente nelle prime forme (molto simili alle attuali) di queste querce, o da una loro introgressione in taxa ancestrali, e da un isolamento coevo che è stato poi favorito dalla complessa orogenesi del Mediterraneo nel Miocene-Pliocene. L'ipotesi dell'origine estremamente antica, nella Paratetide, sarebbe supportata dalle

nostre ricostruzione filogeografiche e da alcuni rari aplotipi presenti in maniera disgiunta da est ad ovest del Bacino Mediterraneo, che potrebbero rappresentare i resti della stirpe originale. Nel Pliocene, dopo la formazione del clima Mediterraneo (Suc 1984), le forme moderne delle querce mediterranee del gruppo divennero diffuse, e si generarono gradualmente i tre lignaggi divergenti nei diversi settori di formazione del bacino Mediterraneo. All'interno di ogni settore, la migrazione è stata libera fino all'Olocene, compreso l'attraversamento dei maggiori stretti di mare; anche l'ibridazione e l'introggressione sono state probabilmente libere e ripetute fino ai tempi più recenti, contribuendo a confondere maggiormente il segnale filogeografico osservato. La divergenza dei lignaggi Mediterranei nelle differenti macro regioni è attuale ancora oggi.

Concludendo, tra le questioni più rilevanti risultate da questo lavoro dobbiamo citare l'identificazione del forte isolamento genetico al quale sono sottoposte le regioni Mediterranee orientali, la ricchissima diversità genetica rilevata nelle zone del Mar Egeo, il forte collegamento biogeografico tra i Balcani ed i pool genetici Mediterraneo-occidentali in contrasto con quelli del Mediterraneo centrale. Il modello tradizionale di espansione graduale delle specie da un unico luogo e/o da singoli pool genetici (orientali) dovrebbe essere aggiornato e rivisto in una chiave di maggiore complessità. Il ruolo chiave svolto dal nord Africa deve essere ancora chiarito del tutto. A tal fine, per districare in maniera definitiva la complessa filogeografia delle querce mediterranee del gruppo *Ilex*, e per meglio comprenderne i processi evolutivi che stanno alla base della loro speciazione e diversificazione, sono chiaramente necessarie ulteriori indagini che combinino analisi di tipo paleologico, ecologico e genetico su una vasta scala di specie, popolazioni, genomi e territori.

BIBLIOGRAFIA

- **Anderson Marti J. and Willis Trevor J. (2003)** *Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology*. Ecology 84:2, 511-525.
- **Bagnoli F., Y. Tsuda Y., Fineschi S., Bruschi P., Magri D., Zhelev P., Paule P., Simeone M.C., Gonzalez-Martinez S.C. and Vendramin G.G. (2015).** *Combining molecular and fossil data to infer demographic history of Quercus cerris: in sights on European eastern glacial refugia*.
- **Balkenhol N, Waits L P and Dezzani R J (2009)** *Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data*. Ecography 32: 818-830.
- **Blondel J., Aronson J.,(1999)** *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. Oxford University Press,Oxford.
- **Blondel J., Aronson J., Bodiou J., Boeuf G., (2010)** *The Mediterranean Region. Biological diversity in space and time*.
- **Blondel J, Aronson J, Bodiou JY, Boeuf G., (2010)** *The Mediterranean region: Biological Diversity in Space and Time*. Oxford University Press, Oxford.
- **Bohonak A. J. and Vandergast A G (2011)** *The value of DNA sequence data for studying landscape genetic*. Molecular Ecology 20: 2477–2479.
- **Boisvenue, C., Running, S.W., (2006).** *Impacts of climate change on natural forest productivity e evidence since the middle of the 20th century*. Glob. Change Biol. 12, 862e882.
- **Bolte, A., Czajkowski, T., Kompa, T., (2007).** *The north-eastern distribution range of European beech– a review*. Forestry 80,413–429.
- **Bolte, A., Ammer, C., Löf, M., Madsen, P., Nabuurs, G.J., Schall, P., Spathelf, P., Rock, J., (2009).** *Adaptive management in central Europe: climate change impacts, strategies and integrative concept*. Scand. J. For. Res. 24, 471–480
- **Bontemps, J.-D., Herv_e, J.-C., Dhote, J.-F., (2009).** *Long-term changes in forest productivity: a consistent assessment in even-aged stands*. For. Sci. 55, 549e564.
- **Bontemps, J. D., Herv_e, J.-C., Dhote, J.-F., (2010).** *Dominant radial and height growth reveal comparable historical variations for common beech in north-eastern France*. For. Ecol. Manag. 258, 1455e1463.
- **Breda, N., Huc, R., Granier, A., Dreyer, E., (2006).** *Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences*. Ann. For. Sci. 63, 625–644.

- **Brewer S, Cheddadi R, de Beaulieu JL, Reille M (2002)** *The spread of deciduous Quercus throughout Europe since the last glacial period. Forest Ecol Manag* 156: 27-4.
- **Bürger, R., Lynch, M., (1995).** *Evolution and extinction in a changing environment: a quantitative-genetic analysis. Evolution* 49, 151–163.
- **Bussotti F., Pollastrini M., Holland V., Bruggemann W. (2014).** *Functional traits and adaptive capacity of European forests to climate change*
- **Carvalho, A.C., Carvalho, A., Martins, H., Marques, C., Rocha, A., Borrego, C., Viegas, D.X., Miranda, A.I., (2011).** *Fire weather risk assessment under climate change using a dynamical downscaling approach. Environ. Model. Softw.* 26 (9), 1123e1133.
- **Cavender-Bares J, Gonzalez-Rodriguez A, Eaton DAR, Hipp AAL, Beulke A, Manos PS (2015)** *Phylogeny and biogeography of the American live oaks (Quercus subsection Virentes): A genomic and population genetics approach. Mol Ecol* 24: 3668–3687.
- **Chan L. M., Brown J. L. and Yoder A. D. (2011)** *Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 523-537
- **Chatry, C., Le Quentrec, M., Laurens, D., Le Gallou, J.-Y., Lafitte, J.-J., Creuchet B., (2010).** *Rapport de la mission interministerielle 'Changement climatique et extension des zones.*
- **Chen C, Qi ZC, Xu XH, Comes HP, Koch MA, Jin XJ, Fu CX, Qiu YX (2014)** *Understanding the formation of Mediterranean-African-Asian disjunctions: evidence for Miocene climate driven vicariance and recent long-distance dispersal in the Tertiary relict Smilax aspera (Smilacaceae). New Phytol* 204: 243-255.
- **Conord C., Gurevitch J. & Fady B. (2012)** *Large-scale longitudinal gradients of genetic diversity: a meta-analysis across six phyla in the Mediterranean basin.*
- **Davis MB., Shaw RG. (2001)** *Range shifts and adaptive responses to Quaternary climate change. Science* 292(5517):673–679.
- **Denk T and Grimm GW (2010)** *The oaks of western Eurasia: traditional classifications and evidence from two nuclear markers. Taxon* 59: 351–366.
- **Désamuré A, Laenen B, Devos N, Popp M (2011)** *Out of Africa: north-westwards Pleistocene expansions of the heather Erica arborea. JBiogeogr* 38: 164-176.
- **Dercourt, J., Zonenshain, L.P., Ricou, L.E., et al., (1986).** *Geological evolution of the Tethys Belt from the Atlantic to the Pamirs since the Lias. Tectonophysics* 123,241–315.
- **Eaton, D.A.R., Gonzalez-Rodriguez, A., Hipp, A.L. & Cavender- Bares, J. (2015)** *Introgression obscures and reveals historical relationships among.*

- **Eaton DAR, Hipp. AL, Gonzalez-Rodriguez A, Cavender-Bares J. (2015)** *Historical introgression among the American live oaks and the comparative nature of tests for introgression. Evolution* 69: 2587-260.
- **Escudero A, Iriondo J. M. and Torres M. E. (2003)** *Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. Biological Conservation* 113: 351-365.
- **Feliner G. N. (2014).** *Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean Basin.*
- **Galpern P, Manseau M and Wilson P (2012)** *Grains of connectivity: analysis at multiple spatial scales in landscape genetics. Molecular Ecology* 21: 3996-4009.
- **Gavin D.G., Fitzpatrick M.C.,Gugger P.F., Heath K.D., Rodriguez_sanchez F., Dobrowski, S.Z., Hampe A., Sheng Hu F., Ashcroft M.B., Bartlein P.J., Blois J.L.,Carstens B.C., Davis E.B., Guillaume de Lafontaine, Edwards M.E., Fernandez M., Henne P.D., Herring E.M., Holden Z.A.H., Kong W., Liu J, Magri D., Matzke N.J.M.,S. Mcglone M., Saltre F.,Stigall A.L,ERICA Tsai Y. and Williams J.W. (2014)** *Climate refugia: joint inference from fossil records, species distribution models and phylogeography.*
- **Ghannoum, O., Way, D.A. (2011).** *On the role of ecological adaptation and geographic distribution in the response of trees to climate change. Tree Physiol.* 31, 1273–1276.
- **Giorgi F (2006)** *Climate change hot-spots. Geophys. Res Lett* 33.
- **Giuggiola, A., Bugmann, H., Zingg, A., Dobbertin, M., Rigling, A., (2013).** *Reduction of stand density increases drought resistance in xeric Scots pine forests. Forest Ecol. Manage.* 310, 827 835.
- **Govaerts R, Frodin DG (1998)** *World checklist and bibliography of Fagales (Betulaceae, Corylaceae, Fagaceae and Ticodendraceae). Kew Royal Botanic Gardens, Kew.*
- **Greuter, W., (1991).** *Botanical diversity, endemism, rarity, and extinction in the Mediterranean area: an analysis based on the published volumes of Med-Checklist. Bot. Chron.* 10, 63–79.
- **Hewitt, G.M., (2011).** *Mediterranean peninsulas: the evolution of hotspots. In: Zachos, F.E., Habel, J.C. (Eds.), Biodiversity Hotspots. Springer, Berlin, Heidelberg, pp.123–147.*
- **Hipp AL, Eaton DAR, Cavender-Bares J, Fitzek E, Nipper R, Manos PS (2014).** *A framework phylogeny of the American oak clade based on sequenced RAD data. PLoS ONE* 9: e93975.
- **Holderegger R and Wagner H. H. (2006)** *A brief guide to Landscape Genetics. Landscape Ecology* 21:793–796
- **Holderegger R and Wagner H. H. (2008)** *Landscape genetics. Bioscience* 58: 199-207.

- **Holderegger R, Buehler D, Gugerli F and Manel S (2010)** *Landscape genetics of plants*. Trends in Plant Science 15: 675-683.
- **Holsten, A., Dominic, A.R., Costa, L., Kropp, J.P., (2013).** *Evaluation of the performance of meteorological forest fire indices for German federal states*. For. Ecol. Manag. 287, 123e131.
- **Huson D H and Bryant D (2006)** *Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies*. Molecular Biology and Evolution 23(2):254-267.
- **Ian J Wang (2010)** *Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography*. Molecular Ecology 19: 2605–2608
- **IUCN(2016)** *The Red List of Threatened Species*. Version 2015-4.
- **Jactel, H., Petit, J., Desprez-Loustau, M.-L., Delzon, S., Piou, D., Battisti, A., Koricheva, J., (2012).** *Drought effects on damage by forest insects and pathogens: a meta-analysis*. Glob. Change Biol. 18, 267e276.
- **Johnson PS, Shifley RS, Rogers R (2002)** *The Ecology and Silviculture of Oaks*. CABI Publishing, New York, US.
- **Kadereit, J.W., Westberg, E., (2007).** *Determinants of phylogeographic structure: a comparative study of seven coastal flowering plant species across their Euro-pean range*. Watsonia 26, 229–238.
- **Kahle, H.-P., Karjalainen, T., Schuck, A., Ågren, G.I., Kellomäki, S., Mellert, K., Prietzel, J., Rehfuess, K.E., Spiecker, H., (2008).** *Causes and Consequences of Forest Growth Trends in Europe e Results of the RECOGNITION Project*. European Forest Institute Research Report 21. Brill, Leiden.
- **Kappelle, M. (2006) (ed.)** *Ecology and conservation of Neotropical montane oak forests*. Ecological Studies No. 185. Springer-Verlag, Berlin.
- **Kimura M (1980)** *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.
- **Klausmeyer K.R., Shaw M.R. (2009)** *Climate Change, habitat loss, protected areas and the climate adaptation potential of species in Mediterranean ecosystems worldwide*.
- **Kreyling, J., (2010).** *Winter climate change: a critical factor for temperate vegetation performance*. Ecology 91, 1939–1948.
- **Krijgsman, W., (2002).** *The Mediterranean: Mare Nostrum of earth sciences*. Earth Planet. Sci. Lett. 205, 1–12.
- **Lasermann, B., Bräuning, A., (2011).** *The manifestation of drought events in tree rings of beech and oak in Northern Bavaria (Germany)*. TRACE 9, 42–47.

- **Liepelt S, Cheddadi R, de Beaulieu JL, Fady B, Gömöry D, Hussendörfer E, et al. (2009).** *Postglacial range expansion and its genetic imprints in Abies alba (Mill.) - A synthesis from palaeobotanic and genetic data. Rev Palaeobot. Palynol. 153: 139-149.*
- **Lindner, M., Maroschek, M., Netherer, S., Kremer, A., Barbati, A., Garcia-Gonzalo, J., Seidl, R., Delzon, S., Corona, P., Kolstrom, M., Lexer, M.J., Marchetti, M., (2010).** *Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. For. Ecol. Manag. 259, 698e709.*
- **Lindner M., Fitzgerald J.B., Zimmermann N. E., Reyher C, Delzon S., f, Ernst van der Maaten, Schelhaas M., Lasch P., Eggers J., Marieke van der Maaten-Theunissen, Suckow F., Psomas A., Poulter B., Hanewinkel M. (2013).** *Climate change and European forests: What do we know, what are the uncertainties, and what are the implications for forest management?*
- **López de Heredia U., Jiménez P., Collada C., Simeone MC., Bellarosa R., Schirone B., Cervera MT., Gil L (2007)** *Multi-marker phylogeny of three evergreen oaks reveals vicariant patterns in the Western Mediterranean. Taxon 56: 1209-1209.*
- **Lumaret R., Mir C., Michaux H., Raynal V. (2002)** *Phylogeographic variation of chloroplast DNA in holm oak (Q. ilex L.). Mol Ecol 11: 2327–2336.*
- **Magri, D., Fineschi, S., Bellarosa, R., Buonamici, A., Sebastiani, F., Schirone, B., Simeone, M.C. & Vendramin, G.G. (2007)** *The distribution of Quercus suber chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. Molecular Ecology, 16, 5259–5266*
- **Manel S and Holderegger R (2013)** *Ten years of landscape genetics. Trends in Ecology & Evolution 28: 614-621*
- **Manel S, Schwartz M K, Luikart1 G and Taberlet1 P (2003)** *Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecology and Evolution 18(4): April 2003.*
- **Mátyás, C., Vendramin, G.G., Fady, B.,(2009).** *Forests at the limit: evolutionary- genetic consequences of environmental changes at the receding (xeric) edge of distribution. Report from a research workshop. Annu. Forest Sci. 66, 800.*
- **McIntyre PJ, Thorne JH, Dolanc CR, Flint AL, Flint LE, Kelly M, Ackerly DD (2015)** *Twentieth century shifts in forest structure in California: Denser forests, smaller trees, and increased dominance of oaks. Proc Natl Acad Sci USA 112: 1458-1463.*
- **Médail F, Diadema K (2009).** *Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. J Biogeogr. 36: 1333-1345.*

- **Médail, F., Quézel, P., (1997).** *Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. Ann. Missouri Bot. Gard. 84, 112–127.*
- **Medail F., and Diadema K., (2009)** *Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin*
- **Meining, S., Fischer, R., (2011).** *Tree crown condition and damage causes. In: Fischer, R., Lorenz, M. (Eds.), Forest Condition in Europe. 2011 Technical Report of ICP Forests and FutMon. Work report of the Institute for World Forestry 2011/1, Hamburg.*
- **Migliore J, Baumel A, Juin M, Médail, F (2012)** *From Mediterranean shores to central Saharan mountains: Key phylogeographical insights from the genus Myrtus. J Biogeogr 39: 942-956.*
- **Moriondo, M., Good, P., Durao, R., Bindi, M., Giannakopoulos, C., Corte-Real, J., (2006).** *Potential impact of climate change on fire risk in the Mediterranean area. Clim. Res. 31, 85e95.*
- **Modesto IS, Miguel C, Pina-Martins F, Glushkova M, Veloso M, Paulo OS, Batista D (2014)** *Identifying signatures of natural selection in cork oak (Quercus suber L.) genes through SNP analysis. Tree Genet Genomes 10: 1645-1660.*
- **Neophytou C, Aravanopoulos FA, Fink S, Dounavi A (2011a)** *Interfertile oaks in an island environment. II. Limited hybridization between Quercus alnifolia Poech and Q. coccifera L. in a mixed stand. Eur J For Res 130: 623-635.*
- **Neophytou C, Dounavi A, Fink S, Aravanopoulos FA (2011b)** *Interfertile oaks in an island environment: I. High nuclear genetic differentiation and high degree of chloroplast DNA sharing between Q. alnifolia and Q. coccifera in Cyprus. A multipopulation study. Eur J For Res 130: 543–555.*
- **Oh Sang-Hun , Manos Paul S. (2008).** *Molecular phylogenetics and cupule evolution in Fagaceae as inferred from nuclear CRABS CLAW sequences. Taxon vol. 57, no2, pp. 434-451.*
- **Oldfield S., Eastwood A. (2007).** *The red list of oaks.*
- **Orsini L, Corander J, Alasentie A and Hanski I (2008)** *Genetic spatial structure in a butterfly metapopulation correlates better with past than present demographic structure. Molecular Ecology 17: 2629-2642.*
- **Palamarev E. (1989)** *Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. Plant Syst Evol 162: 93-107.*
- **Papageorgiou AC, Vidalis A, Gailing O, Tsiripidis I, Hatziskakis S, Boutsios S, et al. (2008)** *Genetic variation of beech (Fagus sylvatica L.) in Rodopi (N.E. Greece). Eur J For Res 127: 81–88.*

- **Parelle, J., Brendel, O., Jolivet, Y., Dreyer, E., (2007).** *Intra- and interspecific diversity to response to waterlogging of two co-occurring white oak species (Quercus robur and Q. petraea).* *Tree Physiol.* 27, 1027–1034.
- **Parelle, J., Dreyer, E., Brendel, O., (2010).** *Genetic variability and determinism of adaptation of plants to soil waterlogging.* In: Mancuso, S., Shabala, S. (Eds.), *Waterloggi*.
- **Parisod C and Holderegger R (2012)** *Adaptive landscape genetics: pitfalls and benefits.* *Molecular Ecology* 21: 3644-3646.
- **Peakall R and Smouse P E (2012)** GenAlEx 6.5. *Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update.* *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- **Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu J-L, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M (2003)** *Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity.* *Science* 300: 1563.
- **Perry1 W, Lugo R, Hathaway S and Vandergast A G (2010)** *Genetic Landscapes GIS Toolbox, Tools to create genetic divergence and diversity landscapes in ArcGIS.* [Computer Software].V.1. Sacramento, CA, USA.
- **Petit R. J., Hampe2 A. & Cheddadi3 R. (2005)** *Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean.*
- **Richmond J Q, Barr K R, Backlin A R, Vandergast A G and Fisher R N (2013)** *Evolutionary dynamics of a rapidly receding southern range boundary in the threatened California Red-Legged Frog (Rana draytonii).* *Evolutionary Applications* 6: 808-822.
- **Resco de Dios, V., Fischer, C., Colinas, C.,(2007).** *Climate change effects on Mediterranean forests and preventive measures.* *New Forests* 33, 29–40.
- **Robinet, C., Roques, A., (2010).** *Direct impacts of recent climate warming on insect populations.* *Integr. Zool.* 5, 132e142.
- **Rodríguez-Sánchez, F., Pérez-Barrales, R., Ojeda, F., Vargas, P., Arroyo, J., (2008).** *The Strait of Gibraltar as a melting pot for plant biodiversity.* *Quat. Sci. Rev.* 27,2100–2117.
- **Rosenbaum, G., Lister, G.S., Duboz, C., (2002).** *Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene.* *J. Virtual Explor.* 8, 107–130.
- **Savolainen, O., Pyhäjärvi, T., Knürr, T. (2007).** *Gene flow and local adaptation in trees.* *Annu. Rev. Ecol. Evolut. Syst.* 38, 595–619.
- **Scoble J and Lowe A J (2010)** *A case for incorporating phylogeography and landscape genetics into species distribution modelling approaches to improve climate adaptation and conservation planning.* *Diversity and Distributions* 16: 343–353.

- Seidl, R., Fernandes, P.M., Fonseca, T.F., Gillet, F., Jönsson, A.M., Merganicov_a, K., Netherer, S., Arpaci, A., Bontemps, J.D., Bugmann, H., Gonz_alez-Olabarria, J.R., Lasch, P., Meredieu, C., Moreira, F., Schelhaas, M.J., Mohren, F., (2011a). *Modelling natural disturbances in forest ecosystems: a review. Ecol. Model.* 222, 903e924.
- Seidl, R., Schelhaas, M.J., Lexer, M.J., (2011b). *Unraveling the drivers of intensifying forest disturbance regimes in Europe. Global Change Biol.* 17, 2842e2852.
- Seneviratne, S.I., Nicholls, N., Easterling, D., Goodess, C.M., Kanae, S., Kossin, J., Luo, Y., Marengo, J., McInnes, K., Rahimi, M., Reichstein, M., Sorteberg, A., Vera, C., Zhang, X., (2012). *Changes in climate extremes and their impacts on the natural physical environment. Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, NY, USA.*
- Simeone MC, Grimm GW, Papini A, Vessella F, Cardoni S, Tordoni E, Piredda R, Franc A, Denk T (2016) *Plastome data reveal multiple geographic origins of Quercus Group Ilex.*
- Spear S F and Storfer A (2008) *Landscape genetic structure of coastal tailed frogs (Ascaphus truei) in protected vs. managed forests. Molecular Ecology* 17: 4642-4656.
- Spiecker, H., Mielik€ainen, K., K€ohl, M., (1996). *Growth Trends in European Forests e studies from 12 Countries. European Forest Institute Research Report; no. 5. Springer, Berlin.*
- Storfer A, Murphy M A, Evans J S, Goldberg C S, Robinson S, Spear S F, Dezzani R, Delmelle E, Vierling L and Waits L P (2007) *Putting the 'landscape' in landscape genetics. Heredity* 98: 128-142.
- Storfer A, Murphy M A, Spear S F, Holderegger R and Waits L P (2010) *Landscape genetics: where are we now? Molecular Ecology* 19: 3496-3514.
- Storfer A, Murphy M A, Evans J S, Goldberg C S, Robinson S, Spear S F, Dezzani R, Delmelle E, Vierling L and L P Waits (2007) *Putting the 'landscape' in landscape genetics. Heredity* 98: 128–142. doi:10.1038/sj.hdy.6800917; published online 1 November 2006 (Review).
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) *MEGA5 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tovar-Sanchez E, Oyama K (2004) *Natural hybridization and hybrid zones between Quercus crassifolia and Quercus crassipes (Fagaceae) in Mexico: Morphological and molecular evidence. Am J Bot* 91: 1352-1363.
- Usbeck, T., Wohlgemuth, T., Dobbertin, M., Pfister, C., Bürgi, A., Rebetez, M., (2010a). *Increasing storm damage to forests in Switzerland from 1858 to 2007. Agric. For. Meteorol.* 150, 47e55.

- **Vandergast A G, Bohonak A J, Hathaway S A, Boys J and Fisher R N (2008)** *Are hotspots of evolutionary potential adequately protected in southern California?* Biological Conservation 141: 1648-1664.
- **Vandergast A G, Perry W M, Lugo R V and Hathaway S A (2011)** *Genetic landscapes GIS Toolbox: tools to map patterns of genetic divergence and diversity.* Molecular Ecology Resources 11: 158-161.
- **Van Wagner, C.E., (1987).** *Development and Structure of a Canadian Forest Fire Weather Index System. Forestry Technical Report 35. Canadian Forestry Service, Ottawa.*
- **Vessella F., Simeone M.C., Schirone B. (2015)** *Quercus suber range dynamics by ecological niche modelling: from the Last Interglacial to present time.*
- **Williams D A, Wang Y Q, Borchetta M and Gaines M S (2007)** *Genetic diversity and spatial structure of a keystone species in fragmented pine rockland habitat.* Biological Conservation 138: 256-268.
- **Wood D A, Vandergast A G, Barr K R, Inman R D, Esque T C, Nussear K E and Fisher R N (2013)** *Comparative phylogeography reveals deep lineages and regional evolutionary hotspots in the Mojave and Sonoran Deserts.* Diversity and Distributions 19: 722-737.